

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Monika Košťáková

**Morfologie vývojových stádií motolice *Fascioloides magna* a
histopatologické změny u vybraných druhů definitivních hostitelů**

Morphology of *Fascioloides magna* life stages and histopathological changes in
selected species of definitive hosts

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D

PRAHA 2013

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Martinovi Kašnému, bez jehož pomoci by tato práce nevznikla. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu helmintologické laboratoře, jmenovitě Honzovi Pankráčovi za pomoc se šneky, Janě Bulantové za zasvěcení do tajů elektronové a fluorescenční mikroskopie a dále i profesorce Ivě Dykové za pomoc s patologickou částí práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14.8.2013

.....

Abstrakt

Fascioloides magna je motolice původem ze Severní Ameriky, která je významným patogenem zejména u jelenovitých, přičemž může napadat i přežvýkavce chované pro hospodářské účely. Motolice jsou v definitivních hostitelích lokalizovány v jaterní tkáni, kde dokážou dlouhodobě přežívat a produkovat velké množství vajíček, které se žlučovody a střevem dostávají s trusem do vnějšího prostředí.

Tato práce je zaměřena na morfologii jednotlivých vývojových stádií *F. magna*, o kterých se vyskytuje v literatuře doposud jen velmi omezené množství informací. V práci jsou srovnávány získané informace s literárními údaji týkajícími se blízce příbuzné motolici *Fasciola hepatica*. Histologickými, elektron mikroskopickými a dalšími metodami (fluorescenčním značením), byly pozorovány morfologické charakteristiky jednotlivých vývojových stádií. V práci jsou dále popsány patologické změny probíhající v jaterní tkáni definitivních hostitelů. Prostřednictvím výše uvedených metod byly rozšířeny dosavadní poznatky o morfologii *F. magna*, zejména o detaily povrchových struktur a rozmístění receptorových orgánů, z nichž některé byly u fascioloidních motolic popsány poprvé.

Klíčová slova: Morfologie, motolice, *Fascioloides magna*, larvální stádia, dospělec, definitivní hostitel, patologie

Abstract

Fascioloides magna is a trematode originating in North America. It is a significant pathogen, especially in cervids, but it can also infect ruminants kept for agricultural purposes. Adult trematodes are found in the liver tissue of their definitive hosts, where they can survive for a long period of time and produce large quantity of eggs. Those are passed through bile ducts and intestine with feces into the external environment.

This thesis is focused on the morphology of individual developmental stages of *F. magna*. To this date only very limited number of literary resources concerning the topic had been published. Recorded results are compared with literary resources on *Fasciola hepatica*, a closely related trematode. The morphological characteristics of the individual developmental stages were studied by using histological, electron-microscopical and other methods (fluorescent labelling). The thesis also describes pathological changes of the definitive hosts' liver tissue. By means of the stated methods, the thesis expands the existing knowledge on the morphology of *F. magna* especially of surface structures and the distribution of the sensoric organs, some of which have been described for the very first time.

Key words: Morphology, trematode, *Fascioloides magna*, larval stages, adult, definitive host, pathology

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	3
3	Literární přehled	4
3.1	Systematické zařazení	4
3.2	Životní cyklus	4
3.3	Vývojová stádia	6
3.3.1	Vajíčko	6
3.3.2	Miracidium	7
3.3.3	Sporocysta	11
3.3.4	Redie	12
3.3.5	Cerkárie	14
3.3.6	Metacerkárie	16
3.3.7	Infekce a vývoj v definitivním hostiteli	18
3.3.8	Dospělec	19
3.4	Patogenní působení <i>F. magna</i>	21
3.4.1	Typy definitivních hostitelů <i>F. magna</i> dle patologických projevů	23
4	Metodika	27
4.1	Získávání materiálu	27
4.1.1	Sběr a chov meziphostitelských plžů	27
4.1.2	Experimentální nákazy a pitvy plžů	27
4.1.3	Dospělci a vajíčka	27
4.2	Tkáň definitivních hostitelů	28
4.2.1	Přirozeně infikování definitivní hostitelé	28
4.2.2	Experimentálně infikování definitivní hostitelé	28
4.3	Použité pufrы	28
4.4	Histologické zpracování vzorků	29
4.4.1	Zalévání do parafínu	29
4.4.2	Použité barvicí metody pro parafínové řezy	30
4.4.3	Zalévání do JB-4	34
4.4.4	Použité barvicí metody pro řezy v JB-4	35
4.5	Fluorescenční značení protilátkami	37

4.6	Impregnace stříbrem	38
4.7	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii	39
4.7.1	Příprava vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)	39
4.7.2	Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)	40
5	Výsledky	43
5.1	Morfologie vývojových stádií	43
5.1.1	Vajíčko	43
5.1.2	Miracidium	45
5.1.3	Sporocysta	52
5.1.4	Redie	53
5.1.5	Cerkárie	59
5.1.6	Průběh encystace	67
5.1.7	Metacerkárie	68
5.1.8	Dospělec	71
5.2	Patogenní působení <i>F. magna</i>	76
5.2.1	Přirozeně infikování hostitelé	76
5.2.2	Experimentální infekce potkanů	81
6	Diskuze	83
6.1	Morfologie vývojových stádií	83
6.2	Patogenní působení <i>F. magna</i>	94
7	Závěr	97

1 Úvod

Fascioloides magna (Bassi, 1875) je distomní motolice z čeledi Fascioloididae. Oblast jejího původního výskytu se nachází v Severní Americe, přičemž do Evropy byla zavlečena s importovanou lovnou zvěří v polovině 19. století (Swales, 1935). Jedná se o parazita s dvouhostitelským životním cyklem. Jeho přirozeným mezihostitelem je v našich podmínkách vodní plicnatý plž *Galba truncatula* z čeledi Lymnaeidae, nicméně v současné době jsou pozorovány i přirozené nákazy plžů rodu *Radix*, pravděpodobně související s probíhajícím procesem adaptace (Faltýnková *et al.*, 2006; Leontovyč *et al.*, zasláno do redakce).

Základní schéma životního cyklu je podobné blízké příbuzné motolici *Fasciola hepatica*, která je kosmopolitně rozšířená, vyskytuje se tedy i na našem území, kde *F. magna* využívá primárně stejný druh mezihostitelského plže (*G. truncatula*) a i některé druhy definitivních hostitelů, např. tur domácí (*Bos primigenius f. taurus*) (Pybus, 2001).

Některá vývojová stádia těchto motolic jsou od sebe morfologicky jen velmi těžko rozlišitelná, např. vajíčka nelze mikroskopicky spolehlivě odlišit, což komplikuje diagnostiku nákazy definitivních hostitelů na základě koprologie. Na druhou stranu u dospělců jsou rozdíly mezi oběma druhy motolic velmi výrazné. Dospělci se liší jak morfologicky, tak i lokalizací v definitivním hostiteli – *F. hepatica* žije primárně ve žlučovodech, *F. magna* opouzdřená v jaterním parenchymu (Erhardová-Kotrlá, 1971). Zatímco o *F. hepatica*, která je jedním z modelových organismů studia morfologie motolic, existuje mnoho rozsáhlých studií, o morfologii *F. magna* bylo publikováno pouze několik málo starších prací (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Navíc tyto studie, přestože jsou rozsáhlé, byly vypracovány pouze s využitím světelné mikroskopie při pozorování živých jedinců a histologických preparátů. Jiné metody, např. elektronová mikroskopie byla při studiu *F. magna* využita jen u malé části vybraných vývojových stádií, např. při studiu penetrace miracidí do plže, excystace metacerkárie nebo pro stádium dospělce (Coil, 1977; Fried *et al.*, 1986; Naem *et al.*, 2012). Některé další morfologické charakteristiky *F. magna* tak stále zůstávají prostudovány jen částečně, například výskyt senzorických struktur u jednotlivých stádií nebo vývoj cystogenních žláz cercarií a tvorba metacerkariálních obalů, a to přestože odolnost metacerkarií a jejich přežití jsou klíčové pro nákazu definitivních hostitelů.

Definitivní hostitele můžeme dle průběhu infekce rozdělit do tří skupin - specifictí definitivní hostitelé – SDH, nespecifictí - NDH a netypictí hostitelé – NH (Siegelová *et al.*, 2012). Rozsah patogenního působení *F. magna* pak závisí především právě na druhu a tedy typu infikovaného definitivního hostitele (Pybus, 2001). Některé druhy spárkaté zvěře jako např. jelen lesní (*Cervus elaphus*) (SDH) jsou vůči fascioloidóze odolnější a i "silná" nákaza (100

ks dospělců *F. magna*) u nich může dlouhodobě probíhat bez zjevných příznaků, zatímco např. pro srnce obecného (*Capreolus capreolus*) (SDH) může být i "mírná" nákaza (5-10 ks dospělců *F. magna*) fatální (Záhoř, 1965; Erhardová-Kotrlá, 1971). Infekci *F. magna* často provází také další negativní příznaky, kterými mohou být úbytek celkové hmotnosti hostitele nebo také snížení kvality paroží u jelenovitých (Erhardová-Kotrlá, 1971; Chroustová, 1980). Patologické změny v jaterní tkáni, struktura jaterních pseudocyst a rozdíly v jejich napojení na systém žlučových u SDH/NDH jsou předmětem mnohých diskuzí poměrně letitých publikací (Swales, 1935, 1936; Erhardová-Kotrlá, 1971). Některé z těchto aspektů jsou diskutovány také v této práci.

2 Cíle práce

1. Pomocí kombinace různých mikroskopických technik zrevidovat morfologii jednotlivých vývojových stádií motolice *Fascioloides magna*.
2. Popsat patologické změny v jaterní tkáni u jednotlivých typů definitivních hostitelů se zaměřením na napojení pseudocyst na systém žlučovodů.

3 Literární přehled

3.1 Systematické zařazení

Fascioloides magna (Bassi 1975) je motolice z čeledi Fasciolidae (podtřída: Digenea, třída: Trematoda, podkmen: Neodermata, kmen: Platyhelminthes). Motolice této čeledi jsou charakteristické svými velkými rozměry a významnou rolí jako patogenů jak s veterinárním, tak medicínským významem. Fascioloidní motolice jsou parazité trávicí soustavy, a to jak přímo trávicí trubice, tak i jater.

V této čeledi je známo devět zástupců: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciola Jacksoni*, *Fasciola nyanzae*, *Fascioloides magna*, *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*, *Fasciolopsis buski*, *Tenuifasciola (Fasciola) tragelaphi*, *Protofasciola robusta* (Lotfy *et al.*, 2008).

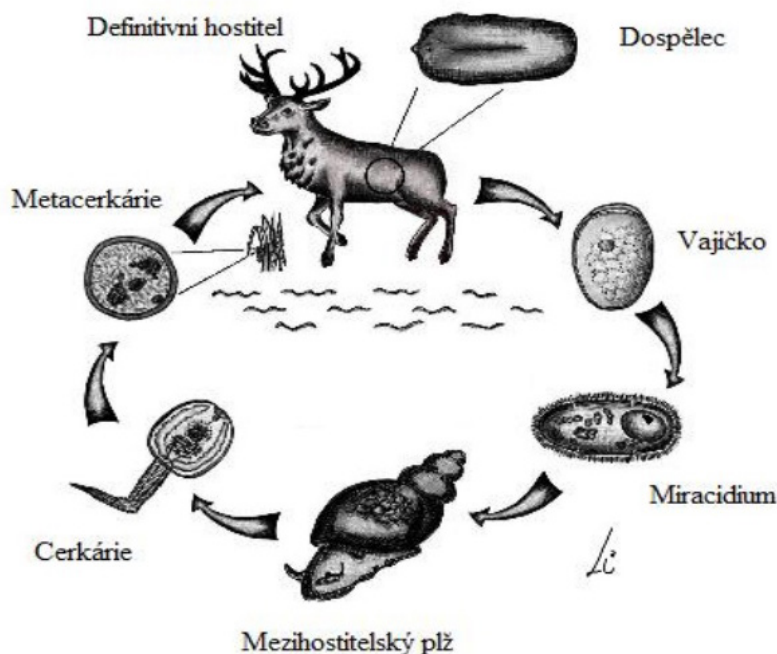
F. magna byla donedávna jediným zástupcem rodu *Fascioloides* (Ward, 1917). Podle nejnovějších morfologických a molekulárních analýz bylo navrženo přeřazení motolice *F. jacksoni* z rodu *Fasciola* také do rodu *Fascioloides* pod názvem *Fascioloides jacksoni* com. nov. (Heneberg, 2013).

3.2 Životní cyklus

Životní cyklus motolice *F. magna* je dvouhostitelský s plžem jako mezihostitelem, ve kterém dochází k asexuální reprodukci. Druhové spektrum mezihostitelských plžů se liší v závislosti na oblasti výskytu (Erhardová-Kotrlá, 1971). V původní oblasti výskytu *F. magna* (Severní Amerika) mezi mezihostitele patří spektrum plžů z čeledi Lymnaeidae. Na našem území se jako hlavní mezihostitel uplatňuje lymnaeidní plž *Galba truncatula*. Recentně se však objevují publikace potvrzující trend rozšiřování mezihostitelské specifiity *F. magna*, což se týká i území České republiky. Ve volné přírodě byli na několika lokalitách nalezeni infikovaní plži rodu *Radix* s vyvinutými cercáriemi *F. magna* (Faltýnková *et al.*, 2006; Leontovyč *et al.*, zasláno do redakce). V laboratorních podmínkách byla také provedena úspěšná experimentální infekce těchto plžů (Huňová *et al.*, 2012).

Jako definitivní hostitel se v životním cyklu *F. magna* uplatňuje široké spektrum živočichů, zejména volně i hospodářsky chovaných přežvýkavců, které dělíme podle průběhu nákazy do tří skupin na specifické (“definitive hosts”), nespecifické (“dead-end hosts”) a netypické (“aberrant hosts”) hostitele (Pybus, 2001; Siegelová *et al.*, 2012).

Vajíčka vyprodukovaná dospělými motolicemi odchází z těla definitivního hostitele společně s trusem do vnějšího prostředí, kde se v nich vyvíjí miracidium (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001). Miracidium je larvální stádium infekční pro mezihostitelské plže, které po opuštění vajíčka vyhledává a aktivně do nich penetruje. V plži se miracidium transformuje na stádium sporocysty, ve kterém asexuální reprodukci dochází ke vzniku redií. Druhá generace redií produkuje cercárie, které opouštějí plže a slouží k diseminaci infekčních stádií do vnějšího prostředí. Cercárie se ve vnějším prostředí aktivně pohybují pomocí dlouhého ocásku a encystují se na pevném podkladu, nejčastěji na vegetaci, kde tvoří odolná stádía – metacerkárie. Pozřením metacerkárií dojde k nákaze definitivního hostitele. V jeho trávicím traktu dochází rozvolnění ochranných obalů metacerkárie a migraci juvenilních motolic do jater, kde jsou enkapsulovány pojivovou tkání hostitele. Po dosažení pohlavní dospělosti motolic dochází k produkci vajíček, které se z jater dostávají systémem žlučových do střeva a zažívacím traktem společně s trusem dále do vnějšího prostředí. Dospělá motolice přežívá ve svém hostiteli i více jak pět let (Erhardová-Kotrlá, 1971).



Obr. 1: Životní cyklus *F. magna* (Kresba L. Jedličková)

3.3 Vývojová stádia

3.3.1 Vajíčko

Vajíčka mají oválný tvar, nicméně jejich tvar a velikost může být velmi variabilní (Campbell, 1961). Pozorovaná variabilita je větší v délce vajec než v jejich šířce Swales (1935). Délka vajíček získaných z trusu jelenů a daňků se pohybuje v intervalu 0,124 – 0,175 mm a šířka 0,081 – 0,117 mm (Erhardová-Kotrlá, 1971). Na tvar a rozměry vajíček může mít také vliv formující se miracidium, které svými pohyby může způsobovat jejich elongaci (Swales, 1935). Vajíčka získaná z trusu mají žlutohnědou barvu stěny, na rozdíl od vajíček získaných z proximální části uteru dospělé, která jsou nejprve bílá, ale po ponechání v okysličené vodě, bylo pozorováno jejich zhnědnutí (Campbell, 1961). Stěna vajíčka je silná 2,5 – 3 μm , její vnější povrch je hladký a na užším konci vajíčka je přítomno víčko (operkulum) (Obr. 2) (Campbell, 1961; Erhardová-Kotrlá, 1971).

Na aboperkulárním konci vajíček byl pozorován 6 – 16 μm dlouhý výběžek (Sinitsin, 1933; Erhardová-Kotrlá, 1971; Naem *et al.*, 2012). Swales (1935) tento výběžek pozoroval téměř u všech vajíček získaných z jaterních pseudocyst a jen u zhruba 20 % získaných z trusu. Výběžek vyčníval malým pórem situovaným mírně mimo střední osu vajíčka. Tyto výběžky zřejmě vznikají v průběhu formace vajíček, protože byly nacházeny pouze na vajíčkách získaných z uteru dospělců (Campbell, 1961), mimo uterus následně docházelo k jejich odlamování.

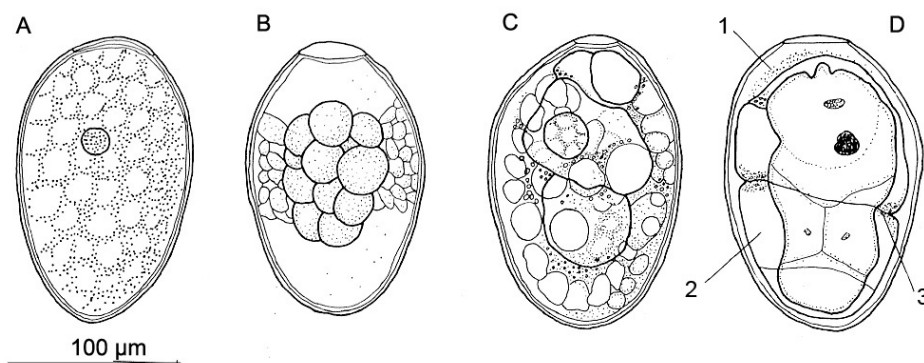
Vajíčko obsahuje vitelinní a zárodečné buňky, které prosvítají skrz vaječnou stěnu (Erhardová-Kotrlá, 1971). Vitelinních buněk je ve vajíčku větší množství, přibližně 40 (Swales, 1935). Motolicí čerstvě nakladené vajíčko je neembryonované (Campbell, 1961) a v tomto stavu se dostává i do vnějšího prostředí (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971).

3.3.1.1 Embryogeneze vajíčka

Ve vnějším prostředí se zárodečné buňky začínají dělit a mezi 8. a 10. dnem (při 21°C v laboratorních podmínkách) se tvoří stádium moruly (Erhardová-Kotrlá, 1971). Formující se embryo se nachází ve středu vajíčka a je obklopeno vitelinními buňkami (Obr. 2 B). V přední části vajíčka vzniká světlá oblast, ve které se nenacházejí vitelinní buňky, v literatuře ji autoři označují jako viskózní měchýřek nebo také mukoidní zátku (Campbell, 1961; Erhardová-Kotrlá, 1971). Vitelinní buňky se postupně shlukují a jejich počet se zmenšuje tak, jak jejich obsah využívá pro svoji výživu vznikající embryo (Obr. 2 C) (Erhardová-Kotrlá, 1971). Embryo je obklopeno dvěma velkými vakuolami vyplněnými tekutinou (Obr. 2 D). Od 13. až 14. dne (při 21°C) lze rozpoznat oční skvrny a začínají se formovat i další struktury budoucího miracidia. V přední části miracidia někteří autoři pozorovali zvláštní granulární hmotu, jejíž funkce nebyla prozatím objasněna (Campbell, 1961; Erhardová-Kotrlá, 1971).

Vývoj miracidia je ukončen 17. a 21. dnem (při 21°C), kdy jsou jeho orgány zformovány. K úniku miracidia z vajíčka do prostředí dochází až 28. a 31. dnem (Erhardová-Kotrlá, 1971).

Na průběh embryogeneze vajíček má významný vliv teplota - snížení teploty vývoj prodlužuje, naopak zvýšená teplota ho urychluje (Erhardová-Kotrlá, 1971). Díky možnosti upravovat teplotní podmínky je vývoj v laboratoři rychlejší než v přírodě. Při inkubaci ve výrazně zvýšených teplotách (37 °C) však dochází k abnormálnímu vývoji a k úhynu embryí. V teplejších letních měsících se miracidia v přírodě dokážou líhnout již po sedmi týdnech, většinou je pro jejich vývoj třeba až 10 týdnů, na jaře a na podzim se vzhledem k nižším teplotám tato doba ještě prodlužuje na 10 až 14 týdnů. Při teplotě 2 – 5 °C se vajíčka nevyvíjejí, nicméně jejich uchování při této teplotě po dobu 9 měsíců nemá vliv na pozdější vývoj (Swales, 1935). Vajíčka mohou ve vnějším prostředí i přezimovat a pokračovat ve svém vývoji na jaře, pro úspěšnou hibernaci je však důležitá současně i dostatečná vlhkost, která bývá vyšší v bažinách a ročníštích než na loukách (Erhardová-Kotrlá, 1971). Vajíčka jsou velmi rychle zničena rychlým vyschnutím nebo poklesem vlhkosti pod 50 % (Swales, 1935). Dalším zajímavým zjištěným aspektem, který může mít vliv na životnost vajíček je věk motolice, která vajíčka vyprodukovala (Erhardová-Kotrlá, 1971). Bylo pozorováno, že vajíčka mladších motolic vykazovala vyšší mortalitu než vajíčka starších motolic.



Obr. 2: Embryogeneze vajíčka *F. magna* (Erhardová-Kotrlá, 1971) (Upraveno)

A: Vajíčko izolované z trusu. B: Stádium moruly. C: Základ embrya v centrální části. D: Vajíčko s vyvinutým miracidiem 1 – viskózní měchýřek, 2 – vakuola, 3 – vitelinní membrána.

3.3.2 Miracidium

Miracidia se z vajíčka do prostředí dostávají otvorem ve stěně vajíčka, který vznikne uvolněním operkula. Líhnutí je ovlivněno mnoha faktory, ze kterých nejvýznamnější roli hraje vlhkost, teplota, okysličením vody a světlo (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Z neenviromentálních vlivů zvyšujících počet vylíhlých miracidíí lze zmínit např. inkubaci vajíček s plynným dusíkem (Friedl, 1961).

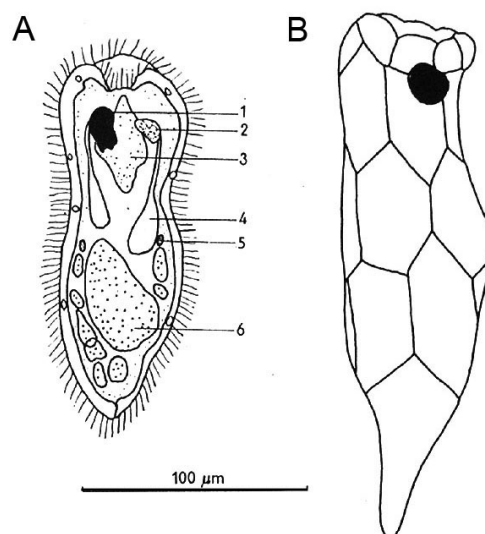
Miracidium má podlouhlý tvar těla, přední část těla je širší a směrem dozadu se tělo zužuje (Obr. 3 A) (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Povrch miracidia je kryt 21 epiteliálními buňkami (destičkami), které jsou za sebou uspořádány v pěti příčných řadách v počtu 6, 6, 3, 4 a 2 (Obr. 3 B) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Coil, 1977). V epiteliálních destičkách jsou ukotveny cilie, jejichž délka se směrem od přední (délka 10 μm) k zadní (délka 16 μm) části těla prodlužuje (Swales, 1935). Destičky obsahují velké množství mitochondrií a jsou bohaté na glykogen, zejména jejich poslední dvě řady nacházející se v zadní části těla (Coil, 1981). Epiteliální destičky kryjí celý povrch miracidia, kromě apikální papily (v literatuře také jako terebratorium) a mezibuněčných valů, ve kterých se nacházejí malá elektrondenzní granula (Coil, 1977). Propojeny mezi sebou jsou prostřednictvím desmozomů, kterými jsou zároveň připojeny k apikální papile (Coil, 1981).

Apikální papila je rekraktilní, silně muskularizovaný orgán nacházející se v přední části těla miracidia (Erhardová-Kotrlá, 1971; Coil, 1981). Její povrch je vrásnitý a mění se dle stupně vychlípení, ke kterému dochází během penetrace do meziphostitele (Coil, 1977).

Apikální papilou vyúsťuje apikální žláza, která vyplňuje přední část těla miracidia, v místě vyústění je úzká a rozšiřuje se směrem do těla (Erhardová-Kotrlá, 1971). Pomocí TEM byly v apikální žláze pozorovány dva typy vezikul obalených membránou (Coil, 1981). Větší vezikuly o průměru 0,7 – 0,9 μm jsou tvořeny třemi vrstvami o různé elektronové denzitě. Vnější vrstva (silná 0,046 μm) je elektron denzní, následuje elektron lucidní vrstva (0,1 μm), která odděluje vnější vrstvu od výrazně denzního jádra o průměru 0,6 – 0,75 μm . Druhý typ vezikul se vyskytuje v malém množství a má výrazně menší průměr (0,15 μm). Oba dva typy vezikul jsou využívány v průběhu penetrace miracidia do plže. Po stranách apikální žlázy leží pár laterálních žláz podlouhlého tvaru, které dosahují téměř do poloviny těla (Obr. 3 A) (Erhardová-Kotrlá, 1971).

V blízkosti apikální papily se dále nachází oční skvrna sestávající ze dvou pigmentovaných čoček (o velikosti 15 μm) tvořených drobnými granuly, které k sobě přiléhají (Obr. 3 A) (Campbell, 1961; Erhardová-Kotrlá, 1971). Centrální ganglion je oválného tvaru a leží na úrovni druhé řady epiteliálních destiček (Obr. 3 A) (Erhardová-Kotrlá, 1971). Na centrální ganglion je pomocí nervových výběžků napojeno šest senzorických orgánů ležících v mezibuněčném valu mezi první a druhou řadou destiček.

Exkreční soustava je protonefridiálního typu, v prostřední části těla je laterálně uložen pár plaménkových buněk (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Posteriovní část těla obsahuje zárodečné buňky, které tvoří čtyři až šest zárodečných koulí, z nichž největší se nachází v přední části (Obr. 3 A - 1) (Campbell, 1961; Erhardová-Kotrlá, 1971).



Obr. 3: Miracidium *F. magna* (Erhardová-Kotrlá, 1971) (Upraveno)

A: Miracidium (nákres dle barvení methylenovou modří). 1 – oční skvrna, 2 – centrální ganglion, 3 – apikální žláza, 4 – penetrační žlázy, 5 – plaménková buňka, 6 – zárodečná buňka. B: Tvar a uspořádání epiteliálních buněk na těle miracidia.

3.3.2.1 Vyhledávání a průnik do meziphostitele

Miracidium se po vylíhnutí z vajíčka aktivně pohybuje ve vodním prostředí pomocí bohaté povrchové ciliatury aktivně a penetruje do meziphostitelského plže (Swales, 1935). Životnost miracidia je omezená, miracidium nemá trávicí soustavu, a tudíž během vyhledávání meziphostitele nepřijímá potravu. Vliv na aktivitu a délku života má i teplota - při teplotě 25°C byla miracidia schopna pohybu 8 až 12 hodin (Campbell, 1961). Snížení teploty výrazně zpomaluje jejich aktivitu, ale zvyšuje dobu přežívání, zřejmě díky snížené aktivitě nedochází k takové spotřebě zásobních látek. Při snížené teplotě však miracidia nebyla schopná penetrovat do plže do té doby, než došlo k jejímu opětovnému zvýšení. Swales (1935) udává, že miracidia *F. magna* nevykazují preferenci vůči svým přirozeným meziphostitelským plžům a ochotně napadají i jiné plže, tento autor také u miracidí nepozoroval chemotaxi ani fototaxi. K opačnému výsledku došel (Campbell, 1961) při pokusu s trojramennou komůrkou, kdy byla miracidia výrazně atrahována osvětleným ramenem, nehledě na jeho orientaci v prostoru. Stejný autor pomocí filtračního papírku impregnovaného šnečí tělní tekutinou také prokázal, že hemolymfa výrazně atrahuje miracidia, zatímco kontrolní papírek nevyvolal žádnou reakci. Ke stejnému výsledku dospěla i Erhardová-Kotrlá (1971), která u miracidí *F. magna* potvrdila silnou foto a chemotaxi. Geotaxe prokázána nebyla, ale bylo pozorováno, že miracidia se nejčastěji zdržují těsně pod vodní hladinou. Rychlost odpovědi na podnět meziphostitelského plže může být ovlivněna i délkou inkubace vajíček, miracidia, která byla

inkubována delší dobu, rozpoznávala plže rychleji (Campbell a Todd, 1955a).

K penetraci miracidíí do těla plže dochází v oblasti na hlavy, tykadel, plicního vaku a nohy (Erhardová-Kotrlá, 1971). Coil (1981) pozoroval, že miracidia penetrovala do plže ve skupinkách o několika jedincích. V jedné z provedených studií byl také pozorován zvláštní případ neúspěšné penetrace, při které se některá miracidia po prvotním kontaktu s tělem plžem uvolnila, neorientovaně plavala a posléze se přímo v nádobě transformovala na sporocysty (Campbell a Todd, 1955b).

Počáteční uchycení miracidia k tělu plže probíhá pomocí přísavkovité apikální papily, která se vysune (Coil, 1977). Po ukotvení dojde k narušení povrchu plže a vytvoření léze. Apikální papila vybíhá prstovitými výběžky do tkáně plže, do které jsou vylučovány malé vezikuly ($0,16\ \mu\text{m}$). Ve tkáni plže se obsah těchto granul rychle uvolňuje. Dále se během penetrace do tkáně uvolňují i vezikuly obsažené v apikální žláze a penetračních (laterálních) žlázách (Erhardová-Kotrlá, 1971; Coil, 1981). Průnik do plže je tedy kromě mechanického průniku tkáně zřejmě podpořen i enzymatickými složkami obsaženými v jednotlivých sekrečních vezikulách. Pomocí TEM byla pozorována degradace kolagenových vláken ve tkáni plže (Coil, 1981). Toto pozorování odpovídá i dřívějším výsledkům získaných pomocí SEM, kdy po odstranění penetrujícího miracidia byl v lézi nalézán amorfní materiál (Coil, 1977).

Doba potřebná pro průnik do plže se v pokojové teplotě se pohybuje mezi dvěma až čtyřmi hodinami (Coil, 1977). Bylo pozorováno, že rychlost penetrace se odvíjí i od „kondice“ miracidia, na kterou má vliv např. doba, po jakou již před započítím penetrace miracidium vyhledávalo plže, nebo délka inkubace ve vajíčku (Erhardová-Kotrlá, 1971).

3.3.2.2 Proces odvržení epiteliálních destiček

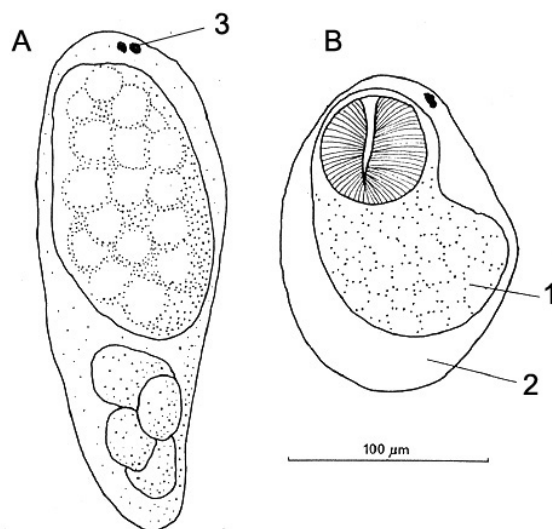
Krátce po počátku penetrace miracidii (dvě minuty) do plže *Fossaria bulimiodes* byla pomocí SEM pozorována ztráta povrchových cílů z destiček (Coil, 1977). Jednotlivé destičky byly buď odvrhnuty do dvou hodin od iniciace penetrace ještě ve vnějším prostředí, nebo jich část zůstala stále na povrchu miracidia i po průniku do těla plže (Coil, 1977, 1981). Při penetraci do plže *G. truncatula* miracidia vnikala do tkáně plže stále s epiteliálními destičkami na svém povrchu (Erhardová-Kotrlá, 1971). K jejich odvržení došlo až 20 – 30 hodin od průniku do plže a to nejprve ve střední části těla (tj. 3 a 4. řada). Destičky z přední (na kterých stále byly pozorovány cíle) a zadní části byly odloučeny až v pozdějších fázích infekce.

Mechanismus uvolňování destiček je prostudován pomocí TEM u miracidíí penetrujících do plže *F. bulimiodes* (Coil, 1981). Zhruba 40 minut od počátku penetrace se v oblasti pod destičkami začínají tvořit malé prostory a dochází k jejich pozorovatelnému rozvolnění. Dále dochází i k degeneraci organel, krysty mitochondrií přestávají být znatelné a glykogen mění svoji konfiguraci a vytváří elektrondenzní shluky.

3.3.3 Sporocysta

Sporocysty jsou jednoduchá a málo pohyblivá larvální stádia, v plžích se nacházejí buď v blízkosti místa penetrace, nebo v některých orgánech, zejména v plášťové dutině, noze, uvnitř a okolo plicního vaku, trávicích orgánů a bílkovinné žlázy (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Nikdy se však nenacházejí v hepatopankreatu a ledvinách.

Sporocysta po invazi tkání plže podstupuje sérii morfologických změn. Dochází k zatažení apikální papily a zakulacení přední části těla (Erhardová-Kotrlá, 1971). Povrch sporocysty je po odvržení destiček pokryt tegumentem, jehož apikální část tvoří četné mikrovilární výběžky (Coil, 1977). V tegumentu se nacházejí drobná elektrondezní granula, která byla u miracidia pozorována již v mezibuněčných valech (Coil, 1981). Dále dochází k resorpci většiny miracidálních orgánů. Společně s retrakcí apikální papily vymizí i apikální žláza, ačkoliv během penetrace nedochází k využití všech žláзовých produktů (Erhardová-Kotrlá, 1971; Coil, 1981). Centrální ganglion také postupně degeneruje, 8 až 10 hodin po penetraci jsou pozorovatelné jeho pozůstatky, po 20 až 30 hodinách již není přítomen (Erhardová-Kotrlá, 1971). Oční skvrna je po transformaci často přítomná po dobu několika dní (Obr. 4 A, B) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Laursen a Yoshino, 1999). U čoček ve většině případů dochází k jejich separaci na dvě části, které se pak vyskytují v různých částech těla - buď v blízkosti střední části těla, nebo na jeho opačných koncích (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Zcela zachován zůstává exkreční systém v podobě dvou plaménkových buněk (Swales, 1935; Laursen a Yoshino, 1999). V zadní části těla se nachází zárodečné buňky, které tvoří zárodečnou kouli (Obr. 4 A) (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Jedna ze zárodečných buněk roste víc než ostatní a posouvá se do středu těla, posléze se z této zárodečné koule vyvíjí mateřská redie (Obr. 4 B) - každá sporocysta většinou obsahuje jednu mateřskou redii a čtyři až pět zárodečných koulí (Erhardová-Kotrlá, 1971). V některých případech se mateřská redie vyvine i z dalších zárodečných buněk. Maximální pozorovaný počet byl čtyři až šest redií, které mají již částečně vyvinutou trávicí soustavu, ale mají však menší rozměry (Erhardová-Kotrlá, 1971). Přibližně mezi 8. až 15. dnem po nákaze (v laboratorních podmínkách) dosahuje sporocysta konečné velikosti 0,3 – 0,4 mm, redie se začne aktivně pohybovat a protržením se uvolní ze sporocysty, která hyne. Swales (1935) udává únik mateřské redie již šestý den, společně s touto vyvinutou redií pak dochází i k uvolnění nedovyvinutých redií, které se mohou uchytit ve tkáni plže. V průběhu *in vitro* experimentu se sporocystami bylo popsáno uvolnění vyvinuté redie pomocí porodního otvoru v zadní části sporocysty, zda sporocysta následně uhynula, autoři neudávají (Laursen a Yoshino, 1999).



Obr. 4: Vývoj sporocysty *F. magna* v plži. (Erhardová-Kotrlá, 1971) (Upraveno)
 A: Sporocysta 5 – 6 dpi. B: Sporocysta 8 – 12 dpi. 1 – mateřská redie, 2 – povrch sporocysty, 3 – pozůstatek oční skvrny.

3.3.4 Redie

Fascioloides magna zahrnuje ve svém vývojovém cyklu dvě generace redií - mateřskou a dceřinou, které lze rozpoznat i na základě morfologických charakteristik (Obr. 5). Tyto generace se liší také v produkci larválních stádií, kdy pouze dceřiná redie dokáže produkovat cercárie (Erhardová-Kotrlá, 1971; Vignoles *et al.*, 2006). Vzácně byla u *G. truncatula* pozorována i třetí generace redií, jejichž vývoj byl však retardovaný (Vignoles *et al.*, 2006).

3.3.4.1 Mateřské redie

Mateřské redie po opuštění sporocysty za pomoci dobře vyvinuté svaloviny aktivně migrují tkáněmi plže. Nejčastěji se nacházejí v ledvinách, v samičích pohlavních orgánech: bílkovinné žláze, oviduktu, plicním vaku a okolo análního póru (Wu, 1954; Erhardová-Kotrlá, 1971).

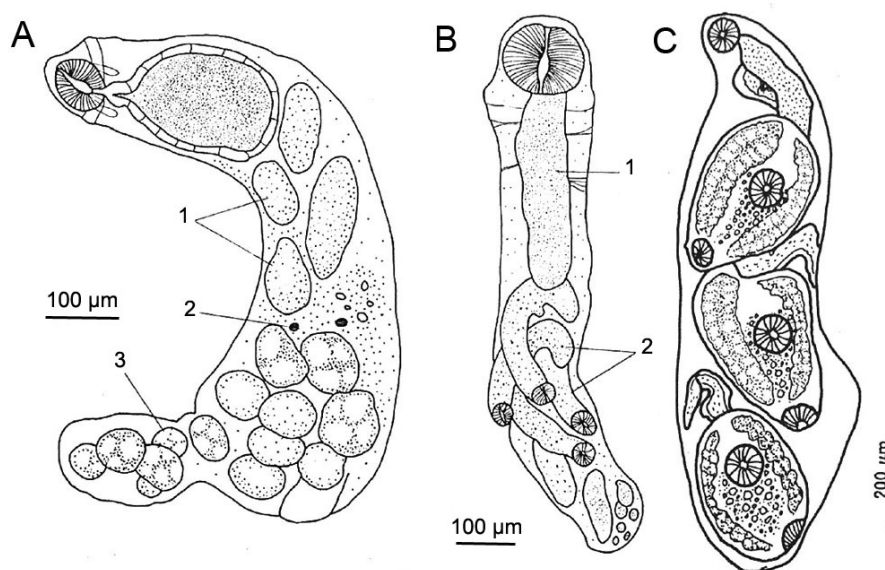
Tělo mateřské redie má podlouhlý tvar se zakulacenou zadní částí. Mezi výrazné povrchové struktury patří muskulární límec umístěný v přední části těla (Obr. 5 A,B), zhruba za pharyngem, v zadní části těla se nacházejí dva velké výběžky (procruscula) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Laursen a Yoshino, 1999; Faltýnková *et al.*, 2006). Dospělé mateřské redie získané z plže *G. truncatula* mají rozměry 1,0-1,13 x 0,226 – 0,312 mm (Erhardová-Kotrlá, 1971). Druh hostitelského plže má na velikost redií významný vliv, např. vývoj redií v plži *Stagnicola palustris nuttalliana* je pomalejší a redie z těchto plžů dosahují menších rozměrů (Swales, 1935). Redie mají oproti předešlým larválním stádiím vyvinutou trávicí soustavu skládající

se z malého ústního otvoru, výrazného svalnatého pharyngu (0,098 – 0,124mm), krátkého oesophagu a dlouhého střeva, které někdy dosahuje až úrovně procruscul (Erhardová-Kotrlá, 1971; Vignoles *et al.*, 2006). Střevo je 0,365 – 0,582 mm dlouhé a je slepě zakončeno, jeho epitel je tvořen jednou vrstvou plochých buněk (Erhardová-Kotrlá, 1971). Redie se aktivně živí tkáněmi plže a trávenina z přijaté potravy zabarvuje obsah střeva do zelena (Erhardová-Kotrlá, 1971; Faltýnková *et al.*, 2006). Po stranách okolo pharyngu a oesophagu se nacházejí malé jednojaderné buňky, také nazývané jako salivární, které zřejmě souvisejí s trávicí soustavou, ale jejich přesný počet a funkce nejsou známy (Obr. 5A) (Erhardová-Kotrlá, 1971). Po stranách oesophagu se nachází nervová soustava v podobě páru ganglií. Exkreční systém je v literatuře prozatím popsán jen stroze - ve střední části těla jsou ve skupině nahromaděny plaménkové buňky a celá exkreční soustava ústí na povrchu zadní části těla exkrečním pórem (Swales, 1935). V zadní části těla se také nacházejí zárodečné buňky tvořící zárodečné koule o různé velikosti a počtu (Obr. 5 A). Ze zárodečných koulí se posléze vyvíjí čtyři až šest dceřiných redií, u nichž lze rozeznat výrazný pharynx (Obr. 5 B). Kolem 30. dne po infekci (v laboratorních podmínkách) se dceřiné redie uvolňují z mateřské redie do tkáně plže (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971).

3.3.4.2 Dceřiné redie

Dceřiné redie mají podobnou stavbu těla jako mateřské (Wu, 1954). Swales (1935) uvádí, že spolehlivě je od sebe lze morfologicky rozlišit podle přítomnosti límce (záhyb tegumentu). U mateřské redie se límec nevyskytuje (Obr. 5 C). Dalším diferenčním znakem je velikost pharyngu vzhledem k velikosti těla. Pharynx dceřiné redie je vůči tělu menší než u redie mateřské, jejíž pharynx je výrazný (Obr. 5) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Vignoles *et al.*, 2006). Dceřiné redie jsou také oproti mateřským daleko méně pohyblivé (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Zárodečné buňky v zadní části těla dceřiné redie rostou a utváří 8 – 12 shluků, ze kterých se posléze vyvíjejí cercárie. Ve fázi produkce cercárií redie velmi rychle rostou, až na maximální pozorovanou velikost 3 mm x 0,33 mm (Swales, 1935; Vignoles *et al.*, 2006).

Množství vyprodukovaných cercárií se liší dle pozorování u různých meziphostitelských plžů. U plže *G. truncatula* bylo pozorováno maximálně šest cercárií (Erhardová-Kotrlá, 1971; Vignoles *et al.*, 2006) u *Fossaria parva* jich bylo pozorováno až deset (Swales, 1935). U méně vhodných meziphostitelských plžů *Stagnicola palustris nuttaliana* a *Lymnea stagnalis* byly v redii pozorovány maximálně tři cercárie (Swales, 1935; Wu, 1954).



Obr. 5: Redie *F. magna* (Erhardová-Kotrlá, 1971) (Upraveno)

A: Mateřská redie. 1 – střevo, 2 – plaménková buňka, 3 – zárodečné buňky, B: Mateřská redie s vyvinutými dceřinými rediemi. 1 – střevo, 2 – dceřiná redie. C: Zralá dceřiná redie s vyvinutými cercáriemi.

3.3.5 Cercárie

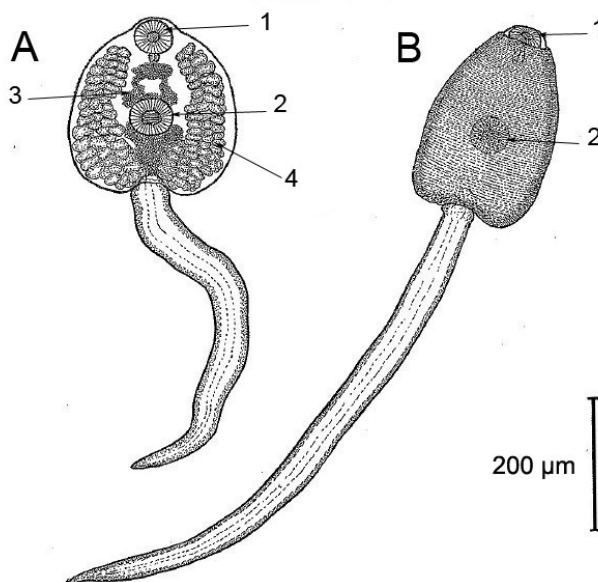
3.3.5.1 Proces dospívání cercárie

K formaci cercárií dochází v dceřiných rediích, kde během jejich vývoje dochází k tvorbě jednotlivých orgánových soustav, včetně cystogenních žláz. Již v těle redie se cercárie aktivně pohybují, následně opouštějí tělo redie a migrují do hepatopankreatu a rozmnožovacích orgánů plže, aby zde dokončily svůj vývoj (Erhardová-Kotrlá, 1971). V hepatopankreatu setrvávají cercárie alespoň čtyři dny, než plně dospějí a opustí tělo meziphostitele (Swales, 1935).

Mezi juvenilní a zralou cercárií je hned několik výrazných rozdílů. Nezralá cercárie, která opustí redii má po stranách těla nahromaděny produkty cystogenních buněk uspořádaných do tvaru podkovy (Obr. 6 A) (Swales, 1935). Ocásek u těchto cercárií je nedovyvinutý a výrazně kratší (Swales, 1935; Faltýnková *et al.*, 2006).

U zralých cercárií, které opustily meziphostitele, se již „podkova“ žlázových buněk nevyskytuje, ale cystogenní materiál místo toho tvoří okolo těla vrstvu silnou 11 – 13 µm (Obr. 6 B) (Swales, 1935). Charakter tohoto cystogenního materiálu byl experimentálně zkoumán pomocí inkubace cercárií s fenolickou sloučeninou katecholem (Campbell, 1960a). Během inkubace došlo ke změně zabarvení (do hněda) a vytvrzení proteinů („tanning“) tohoto cystogenního materiálu. V cystogenních granulech se tedy zřejmě nachází enzym způsobující oxidaci fenolů. Tělo cercárie bylo tímto materiálem pokryto z obou stran, kromě přední

části těla s ústní přísavkou, břišní přísavky, místa připojení ocásku a celého ocásku (Swales, 1935; Campbell, 1960a). Dále byla u cercárií pozorována další skupina cystogenních granul tyčkovitého tvaru, která byla uspořádána do skupin těsně pod povrchem cercárie, u nich ale k vytvrzení nedošlo (Campbell, 1960a).



Obr. 6: Vývoj cercárie *F. magna* (Swales, 1935) (Upraveno)

A: Detail tělní části nezralé cercárie s cystogenními produkty v žlázách. B: Zralá cercárie s dlouhým ocáskem a cystogenními produkty v tegumentu. 1 – ústní přísavka, 2 – břišní přísavka (acetabulum), 3 – exkreční granula, 4 – cystogenní žlázy.

3.3.5.2 Morfologie cercárie

Na ventrální straně těla cercárie se nacházejí dvě výrazné přísavky - ústní a břišní (acetabulum), břišní ($55 - 70 \mu\text{m}$) je mírně větší než ústní ($44 - 58 \mu\text{m}$) (Obr. 6) (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Přední část těla je pokryta četnými krátkými trny, které se na těle nacházejí až do úrovně acetabula. Ústní přísavka se nachází v přední části těla a je asociována se začátkem trávicí soustavy - ústním otvorem, na který navazuje pharynx, krátký oesophagus a střevo, které se před acetabulem rozděluje na dvě větve vedoucí po stranách až na konec těla (Erhardová-Kotrlá, 1971; Faltýnková *et al.*, 2006). Exkreční systém je tvořen dvěma širokými kanály, které probíhají téměř celým tělem až k jeho zadní části, kde leží exkreční měchýř. Ve střední části těla se v exkrečních kanálech vyskytují nápadná světlolomná granula. Z exkrečního měchýře pokračuje dále jedna větev exkrečního kanálu celou délkou ocásku, okolo tohoto kanálu se nacházejí žlázové buňky (Erhardová-Kotrlá, 1971). Ocásek je silně osvalený. Údaje o jeho délce se v literatuře liší, zřejmě i proto, že na jeho délku má

významný vliv použítá fixace. [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#) udává délku 58.6 - 78 μm (neudává fixaci), zatímco [Swales \(1935\)](#) za použití fixace horkým 70% etanolem naměřil 75,5 - 99 μm .

Zárodečné buňky cercárií se barví tmavě pomocí H&E, větší část se nachází se v zadní části těla mezi acetabulem a exkrementním měchýřem ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#)). Další shluk zárodečných buněk leží v místě bifurkace střeva. [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#) se domnívala, že tyto buňky tvoří základy části reprodukčních orgánů dospělého.

3.3.5.3 Uvolňování cercárií a encystace ve vnějším prostředí

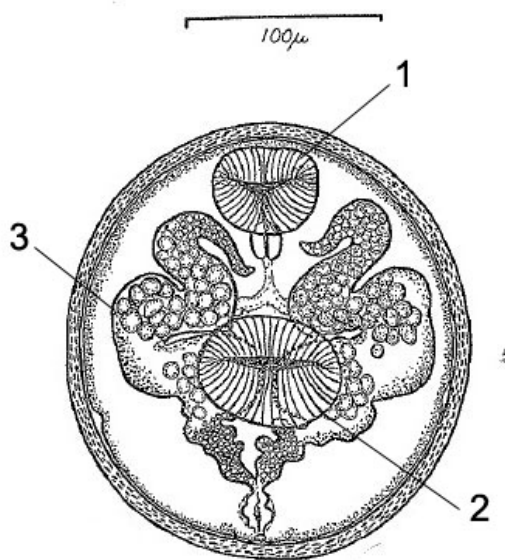
Z mezihostitelského plže se zralé cercárie uvolňují v nepravidelných intervalech, jejich únik byl pozorován v různých denních dobách, a to jak v ranních a odpoledních hodinách ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#)), tak i v průběhu noci ([Swales, 1935](#)). Na vylučování cercárií v laboratorních podmínkách neměla vliv výměna vody, změna pH ani světlo ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#)). Proces vylučování cercárií a také zda se jedná o aktivní nebo pasivní děj doposud nebylo u *F. magna* popsáno. V jedné studii však byl pozorován zvláštní případ vylučování cercárií i metacercárií s trusem plže, nicméně autoři dospěli k závěru, že do trávicí soustavy plže larvální stádia pronikla díky silné infekci ([Campbell a Todd, 1956](#)).

Plovoucí cercárie nevykazuje zřejmou fototaxi a rychle adhezuje k povrchu svojí ventrální stranou ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#)). Procesem encystace dochází k vytvoření infekčních stádií zvaných metacercárie. Tělo cercárie nejprve prochází sérií kontrakcí a ocásek se také aktivně pohybuje ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#)). Po nějaké době kontrakce ustanou a cercárie začne sekretovat cystogenní materiál, který na jejím povrchu utvoří průhledný obal. Po vytvoření tohoto obalu v něm cercárie aktivně rotuje po i proti směru hodinových ručiček a produkuje další cystogenní materiál s jehož pomocí se tvoří další ochranné obaly. Během tohoto procesu také dochází k odvržení ocásku. Ochranné obaly jsou zpočátku měkké, po 12 hodinách dochází k jejich ztuhnutí. Dochází také ke změně barvy povrchových vrstev metacercárie, zpočátku je vnější vrstva bělavá, posléze se zabarví dohněda ([Campbell a Todd, 1956](#); [Campbell, 1960a](#)). Ke změně barvy i vytvrnutí obalů dochází oxidací fenolů na chinony (quinone tanning) pomocí enzymu fenolázy, která je obsažena v cystotvorných granulech tvořících vnější vrstvu. Dále bylo pozorováno, že metacercárie encystované v přírodě mají silnější obaly než ty, které byly vytvořeny v laboratorních podmínkách, nicméně příčina tohoto jevu není známa ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#)).

3.3.6 Metacercárie

Metacercárie je z dorzální strany zakulacená, z laterálního pohledu má „helmovitý“ tvar ([Swales, 1935](#); [Erhardová-Kotrlá, 1971](#)). Během procesu encystace dochází okolo samotného

těla metacerkárie k vytvoření dvou vrstev ochranných obalů ze sekrečních produktů cystogenních žláz (Erhardová-Kotrlá, 1971). Vnější obal je mohutnější a jeho průřez měří 10 až 15 μm , vnitřní obal je slabší o síle 7 až 9 μm . Vnější obal má hrubý a nerovný povrch a pokrývá téměř celý obvod metacerkárie (Obr. 7), kromě oblasti na ventrální straně, kterou je metacerkárie adherovaná k podkladu (Swales, 1935; Fried *et al.*, 1986). Vnitřní obal má hladký povrch a obklopuje celou metacerkárii, na jeho ventrální straně se v něm nachází jasně definovaná ventrální zátka (Fried *et al.*, 1986). Metacerkárie se ve svých obalech aktivně pohybuje (Erhardová-Kotrlá, 1971). Skrz obaly prosvítají na povrch světlolomná granula, která se nalézají v exkrečních kanálech (Obr. 7). Po mechanickém uvolnění metacerkárie z obalů byla pozorován výskyt ústní přísavky, pharyngu a acetabula (Obr. 7), další vnitřní struktury u metacerkárie *F. magna* doposud blíže popsány nebyly.



Obr. 7: Metacerkárie *F. magna* (Swales, 1935) (Upraveno)
1 – ústní přísavka, 2 – břišní přísavka, 3 – exkreční kanál s granuly.

3.3.6.1 Přežívání metacerkárií ve vnějším prostředí

Metacerkárie jsou ve vnějším prostředí vystaveny mnoha faktorům, které ovlivňují délku jejich přežívání a schopnost infikovat definitivního hostitele. Mezi nejdůležitější a nejprozkoumanější faktory patří teplota a vlhkost prostředí. V laboratorních podmínkách bylo pozorováno, že metacerkárie vydrží i několikadenní vysušení - na stěnách akvária po dobu sedmi dní, na rostlinách je to až deset dnů (Erhardová-Kotrlá, 1971). Ve schnoucí trávě je doba přežívání udávána v rozpětí 10 – 18 dní, pokud však zůstane dostatečně vlhká, tak jsou metacerkárie schopny přežít až dva a půl měsíce, zkrmení takového krmiva s metacerkári-

emi může být příčinou nákazy (Erhardová-Kotrlá, 1971; Chroustová, 1980).

Významný vnějším faktorem je i teplota, jejíž vliv byl zkoumán na metacerkáriích, kterými byly následně pro kontrolu životaschopnosti krmena laboratorní morčata (Griffiths a Christensen, 1972a). Infekčnost metacerkárií uchovávaných v 21 - 24 °C klesala po 16. dni, zaznamenána však byla ještě u metacerkárií starých 105 dnů. Metacerkárie uchovávané v chladu (3 – 5 °C) byly stále životaschopné po 393 dnech (Griffiths a Christensen, 1972b). Dále bylo pozorováno, že metacerkárie přežijí i krátkodobé zmrazení - při teplotě -5 °C po dobu 3 dnů přežili všichni jedinci, po týdnu při této teplotě již třetina metacerkárií nebyla schopna excystace (Erhardová-Kotrlá, 1971). Z těchto poznatků je tedy zřejmé, že chladné prostředí prodlužuje dobu přežívání a za vhodných klimatických podmínek jsou metacerkárie schopny v prostředí přezimovat a infikovat definitivní hostitele v jarních měsících.

3.3.7 Infekce a vývoj v definitivním hostiteli

Metacerkárie encystované ve vnějším prostředí slouží k perorální nákaze definitivního hostitele. V trávicí soustavě hostitele dochází k rozvolnění ochranných obalů (excystaci) a migraci juvenilního jedince motolice do místa definitivní lokalizace – do jater (Pybus, 2001). Excystované metacerkárie unikají z trávicí soustavy penetrací tenkého střeva v jejunu a duodenu, dále pak migrují ventrální částí peritoneální dutiny až k játrům, do kterých penetrují zhruba již do dvou týdnů po infekci (Presidente *et al.*, 1980). V případě, že hostitel pozře metacerkárii s poškozenými obaly, k infekci nedochází, zřejmě proto, že metacerkárie nepřežije pasáž trávicí soustavou (Swales, 1935).

3.3.7.1 Exystace metacerkárie *in vitro*

Průběh procesu excystace byl zkoumán také *in vitro*, a to při teplotě 42°C v médiu zásaditých žlučových solí a trypsinu (alkaline bile salts trypsin) (Fried a Stromberg, 1985; Fried *et al.*, 1986). Bylo zjištěno, že jedním ze signifikantních faktorů, které mají vliv na excystaci je pH - jako optimální se ukázalo pH 8,2. Při kyselějším pH k excystaci buď vůbec nedošlo (pH 7), nebo nebyla úspěšně zakončena a juvenilní jedinec uhynul (např. při pH 7,4). Během *in vitro* excystace se juvenilní jedinec aktivně pohyboval a rotoval v obalech (Fried a Stromberg, 1985). K uvolnění z obalů došlo po půl hodině a v obalech, které juvenilní jedinec opustil, byly pozorovány pozůstatky granul s exkrečními cest, jejichž část sice byla zachována v těle juvenilní motolice, ale i ta byla nakonec vyvrhnutá.

3.3.7.2 Juvenilní jedinec

Juvenilní jedinec představuje z ontogenetického a morfologického hlediska přechod mezi stádiem cercárie a dospělým jedincem. Tělo juvenila je oblého tvaru a na povrchu se nachází

velké množství trnů (Fried *et al.*, 1986). Přední část je otrněna více než zbytek těla, množství a velikost trnů se zmenšuje v oblasti od acetabula ke konci těla. Na těle se nalézají četné senzorické papily a to okolo ústní přísavky a na okraji acetabula, kde mají papily kopečkovitý tvar. Další papily se nalézají v přední částitěla juvenila laterálně od acetabula.

3.3.7.3 Délka vývoje a dospívání

U přirozených definitivních hostitelů jsou uváděny rozdílné délky prepatentní periody. Erhardová-Kotrlá (1971) udává tři až pět měsíců, zatímco Foreyt a Todd (1976) až 32 týdnů (8 měsíců). Nicméně autoři se shodují v názoru, že doba potřebná pro maturaci motolic nezávisí na druhu hostitele (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1976). U některých hostitelů, např. ovcí a koz, však často dochází k úmrtí hostitele dříve, než motolice stihne dosáhnout dospělosti (Foreyt a Todd, 1976; Foreyt a Foreyt, 1980; Foreyt, 1992).

U experimentálně infikovaných laboratorních zvířat (králíci, morčata) Swales (1935) uvádí, že jejich vývoj byl pomalý, motolice migrovaly po těle zvířat bez dosažení pohlavní dospělosti do doby čtyř měsíců, nicméně základy genitálních primordií byly pozorovány již v raném stádiu vývoje motolic.

3.3.8 Dospělec

Dospělci *F. magna* jsou velkých rozměrů, hodnoty naměřené v jednotlivých studiích se poměrně liší, zřejmě i díky použitým metodám měření, např. pomocí roztlačkových preparátů. Přibližná délka je 41 – 86 mm, přibližná šířka 17 – 31 mm (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971; Marinculić *et al.*, 2002). Zaznamenány však byly i rozměry až 100 mm na délku a 15 – 25 mm na šířku (Naem *et al.*, 2012).

Tělo dospělce je dorzoventrálně zploštělé, oválného tvaru s mírně vystouplou přední částí (Obr. 8) (Erhardová-Kotrlá, 1971). Tělo dospělce má červenohnědé zabarvení a na povrch prosvítají vnitřní orgány, zejména střevo s přijatou potravou (Qureshi *et al.*, 1989; Naem *et al.*, 2012). Dospělec má dvě přísavky – ústní okolo ústního otvoru a břišní (acetabulum), která je větší a leží na ventrální straně těla (Obr. 8) (Jones *et al.*, 2005). Na vnitřním povrchu acetabula byly pomocí SEM pozorovány dva zvláštní trnovité výběžky (Naem *et al.*, 2012). Téměř celý povrch těla je pokryt četnými různě velkými a tvarovanými trny, jejichž množství, tvar i velikosti se mírně liší v závislosti na které části těla se vyskytují (Sinitsin, 1933; Qureshi *et al.*, 1989; Naem *et al.*, 2012). V přední části těla se trnů obecně nachází více a jsou i větší, v okolí acetabula se vyskytují trny pilovitého tvaru s 15 – 22 hroty (Naem *et al.*, 2012). V zadních částech těla červa jsou pouze jednoduchého tvaru s jedním nebo dvěma tupými hroty. V záhybech cirru byly naopak pozorovány malé jednoduché trny.

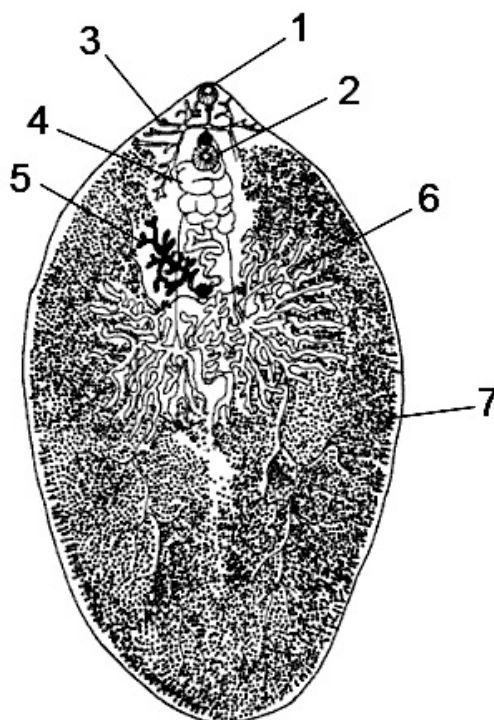
Pod tegumentem se nachází dobře vyvinutá svalovina - vnější okružní, pod ní podélná a šikmá (Erhardová-Kotrlá, 1971). Nervová soustava je tvořena párem hlavových ganglií a podélnými a příčnými nervovými výběžky vedoucími skrz celé tělo. Na povrchu těla bylo pozorováno velké množství senzorických struktur, některé z nich již byly pozorovány už u juvenilních jedinců (Fried a Stromberg, 1985; Naem *et al.*, 2012). Na povrchu ústní přísavky se nacházejí dva typy papil - malé kopečkovité a ciliární papily (Naem *et al.*, 2012). Malé skupinky kopečkovitých a ciliárních papil se nacházejí okolo acetabula a exkrečního póru, dále také v přední části dorzální strany těla. Jednotlivě se vyskytující kopečkové papily se nacházejí mezi trny na ventrální straně v blízkosti acetabula.

Vylučovací soustava je protonefridiálního typu - větvené kanály vedoucí od plaménkových buněk se spojují do dvou větví, které ústí společným vývodem na povrchu v zadní části těla (Erhardová-Kotrlá, 1971; Naem *et al.*, 2012).

Trávicí soustava je tvořena ústním otvorem asociovaným s přísavkou, který pokračuje bukálním prostorem a malým pharyngem (Erhardová-Kotrlá, 1971). Krátký oesophagus se dělí do dvou větví, které jsou dále rozvětvené do menších výběžků (divertikul) a prostupují celým tělem motolice. Předpokládá se, že dospělec *F. magna* se živí krví. Obsah ze střeva a také charakteristický tmavý pigment byl spektrofotometricky charakterizován jako železito porfyrinový komplex a s největší pravděpodobností se jedná o odpadní produkt rozklad hemoglobinu z trávené krve (Campbell, 1960b).

Dospělci *F. magna* jsou hermafrodité (Erhardová-Kotrlá, 1971), stavba jejich pohlavní soustavy odpovídá stavbě typické pro motolice (Smyth a Halton, 1983). Vyústění pohlavní soustavy se nachází v přední části těla v blízkosti acetabula (Obr. 8) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Naem *et al.*, 2012). Kopulační orgán (cirrus) má pórovitý povrch a v jeho záhybech byly pozorovány drobné trny (Naem *et al.*, 2012). Varlata jsou párová laločnatého tvaru, umístěná v těsné blízkosti vedle sebe, zhruba v druhé třetině těla (Obr. 8), jedno z varlat je předsunuto mírně před druhé (Erhardová-Kotrlá, 1971; Jones *et al.*, 2005). Vyprodukované spermie jsou z varlat odváděny chánovody do semenného váčku, který ústí v cirru (Erhardová-Kotrlá, 1971). Samičí část pohlavní soustavy se skládá z větveného ovária (germária) ležícího před varlaty mírně vpravo mimo osu těla (Obr. 8) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Jones *et al.*, 2005). Z ovária odcházejí zárodečné buňky oviduktem do ootypu, okolo kterého se nachází Mehlisova žláza (Erhardová-Kotrlá, 1971). V ootypu dochází k oplodnění a vzniku zygoty. Vitelária obklopují větve trávicího traktu z ventrální strany po celém těle od úrovně břišní přísavky (Ward, 1917; Erhardová-Kotrlá, 1971). V některých případech se nacházejí i dorzálně, ale pouze po stranách na konci těla motolice (Erhardová-Kotrlá, 1971). Ve viteláriích jsou produkovány vitelinní buňky, které po dozrání směřují oviduktem do ootypu, kde mají podstatnou úlohu při tvorbě vajíček. Vajíčka odcházejí z těla motolice skrz uterus, který je zakončen v podobě metratermu ústícího v blízkosti cirru (Obr. 2) (Erhardová-Kotrlá,

1971; Jones *et al.*, 2005). Dospělá motolice *F. magna* má ohromný reprodukční potenciál, během jednoho dne dokáže vyprodukovat i 6000 vajíček (Kingscote, 1950), délka jejího života může přesáhnout i pět let (Erhardová-Kotrlá, 1971), celkem může tedy motolice za celý svůj život vyprodukovat i 110 miliónů vajíček.



Obr. 8: Tělo dospělé *F. magna* z ventrální strany (Jones *et al.*, 2005)

1 – ústní přísavka, 2 – břišní přísavka (acetabulum), 3 – střevo, 4 – uterus, 5 – germárium, 6 – testes, 7 - vitelária

3.4 Patogenní působení *F. magna*

Fascioloides magna negativně působí na hostitele zejména migrací juvenilních motolic tkáňmi a dále pak i dlouhodobým přežíváním v jeho organismu. Nejvíce a nejčastěji zasaženým orgánem jsou játra, která jsou místem definitivní lokalizace dospělých motolic umožňující úspěšné pokračování životního cyklu (Swales, 1935, 1936; Pybus, 2001).

Způsob jakým se nákaza *F. magna* vyvíjí a projevuje, je závislý na mnoha faktorech. Nejdůležitějším z nich je druh hostitele, dále byl pozorován i vliv jeho stáří, pohlaví, fyzické kondice, výživy a intenzity nákazy (Kingscote, 1950; Foreyt a Todd, 1979; Pybus, 2001). Vzhledem k těmto variabilním faktorům může mít nákaza širokou škálu projevů od asymptomatického průběhu až po úhyn napadeného zvířete (Kingscote, 1950; Foreyt a Todd,

1979; Pybus, 2001). K poškození způsobenému motolicí se navíc mohou přidružit sekundární bakteriální infekce a abscesy (Kingscote, 1950).

Pro nákazu *F. magna* jsou nicméně charakteristické některé projevy, které lze pozorovat u většiny hostitelů. Jak již bylo řečeno, játra jsou nejčastěji zasaženým orgánem. V průběhu infekce dochází k jejich zvětšení, někdy až na dvojnásobek původní velikosti, okraje jednotlivých laloků nebývají již ostře vyrýsované a jsou nepravidelného tvaru, dále je v různé míře změněno jejich zabarvení (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt, 1992; Novobilský *et al.*, 2007a). Na jaterní kapsli se někdy vyskytují výběžky fibrinového materiálu (Erhardová-Kotrlá, 1971; ?).

Naprosto specifickým projevem nákazy motolicí *F. magna* je přítomnost tmavého pigmentu ve tkáních, a to zejména v játrech. Kromě jater se může vyskytovat i v jiných tkáních např. v mizních uzlinách, mezenteriu, omentu, v plicích a plicních uzlinách (Swales, 1936; Kingscote, 1950; Foreyt a Todd, 1976; Pybus, 2001). Na základě analýzy tráveniny ze střeva motolice bylo zjištěno, že pigment je tvořen zejména produkty degradace krevního hemoglobinu vznikajícími při trávení krve hostitele motolicí (Campbell, 1960b). Pigment je tedy možno charakterizovat jako odpadní produkt trávení, který je vyvrhován z trávicího traktu motolice a je deponován ve tkáních, kterými motolice migrovala. Motolice v průběhu samotné migrace výrazně poškozují jednotlivé tkáně (Swales, 1936). V literatuře se udává, že migrují zejména juvenilní jedinci, ale v jaterní tkáni byli nalezeni i migrující pohlavně dospělí jedinci produkující vajíčka (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1976). Při migraci dochází ke vzniku i velmi rozsáhlých hemoragií (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1976; Foreyt *et al.*, 1977), někteří autoři se domnívají, že anémie, která byla u některých hostitelů pozorována, je způsobena právě těmito hemoragiami (Foreyt a Todd, 1979). Migrační kanály motolice obsahují značné množství erytrocytů, pigmentu, plazmy (Swales, 1936; Erhardová-Kotrlá, 1971). Hepatocyty těsně přilehlé k migračním traktům jsou degenerované až nekrotické s eosinofilní cytoplazmou (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt, 1992). V jejich okolí se vyskytují infiltráty zánětlivých buněk, zejména eosinofilů, také jsou přítomny makrofágy, které pohlcují leukocyty, erytrocyty a zbytky nekrotických buněk (Swales, 1936; Erhardová-Kotrlá, 1971; Marinković *et al.*, 2013). V některých částech migračních kanálů lze již během migrace pozorovat proliferaci fibroblastů a tvorbu pojivové tkáně, pomocí které se migrační kanál vyhojuje, přičemž vznikají jizvy, vzácně byly v této novotvořené tkáni pozorovány i kalcifikace (Kingscote, 1950; Erhardová-Kotrlá, 1971). Přilehlé portobiliární prostory jsou edematózní a infiltrované četnými eosinofily. Zasaženy jsou i lymfatické dráhy, které mohou být oproti normálnímu stavu výrazně zvětšené (Erhardová-Kotrlá, 1971). V cévním systému jsou často nalézány tromby (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt, 1992).

Obecně nákaza *F. magna* způsobuje úbytek funkční jaterní tkáně, zdravá tkáň je nahrazována fibrózní tkání, pseudocystami a je protkána hemoragiami po migraci (Erhardová-Kotrlá,

1971; Pybus, 2001). V některých případech bylo pozorováno až 75% patologicky pozměněné jaterní tkáně (Foreyt, 1992). Kromě jater mohou juvenilní motolice migrovat i do jiných částí těla a orgánů, kde dochází většinou k jejich enkapsulaci a destrukci (Presidente *et al.*, 1980). Dalším často napadeným orgánem jsou plíce (Foreyt a Todd, 1972, 1976; Presidente *et al.*, 1980), dále byly zaznamenány případy, ve kterých motolice migrovaly do bránice (Swales, 1935), břišní i hrudní dutiny, svaloviny (Conboy *et al.*, 1988) a dokonce i míšního kanálu (Thacker, 2002).

Dalším projevem charakterizujícím nákazu *F. magna* je přítomnost rozměrných cystoidních útvarů nacházejících se v jaterním parenchymu, které obklopují většinou dospělé motolice společně s hnědou tekutinou tvořenou směsí natrávené krve a vajíček (Swales, 1935, 1936).

Tyto pseudocysty, pomocí kterých jsou motolice odděleny pojivem od okolní tkáně, jsou reakcí organismu na přítomnost motolic (Erhardová-Kotrlá, 1971). v pseudocystách se nejčastěji nalézají dva jedinci, nicméně byly pozorovány i případy, kdy byli opouzdření tři, čtyři nebo dokonce až osm, či naopak pouze jeden jedinec (Sinitsin, 1933; Foreyt *et al.*, 1977). Stěna pseudocysty je tvořena pojivovou tkání produkovanou fibroblasty, v případě chronické infekce, jsou mezi vazivem přítomny i infiltráty lymfocytů a plazmatických buněk (Erhardová-Kotrlá, 1971; Marinković *et al.*, 2013).

3.4.1 Typy definitivních hostitelů *F. magna* dle patologických projevů

Podle charakteristické reakce hostitelského organismu na infekci *F. magna* můžeme hostitele rozdělit do tří skupin, jak již bylo dříve navrženo (Pybus, 2001). Dále bylo toto rozdělení upraveno a jednotlivé kategorie hostitelů přesněji definovány jako: Specifičtí definitivní hostitelé (SDH), Nespecifičtí definitivní hostitelé (NDH) a Netypičtí hostitelé (NH) (Siegelová *et al.*, 2012).

3.4.1.1 Specifičtí definitivní hostitelé (SDH)

U tohoto typu hostitelů se motolice v játrech nacházejí opouzdřeny v pseudocystách s tenkou stěnou, ze kterých je žlučovým systémem umožněn odchod vajíček do tenkého střeva a společně s trusem do vnějšího prostředí (Swales, 1935). Dochází tedy k dokončení celého životního cyklu motolice.

Mezi hlavní zástupce SDH se řadí především jednotlivé druhy z čeledi jelenovitých (Cervidae) (Pybus, 2001). V podmínkách České republiky se *F. magna* adaptovala na jelena evropského (*Cervus elaphus*), daňku evropského (*Dama dama*) a srnce obecného (*Capreolus capreolus*) (Novobilský *et al.*, 2007a; Kašný *et al.*, 2012; Erhardová-Kotrlá, 1971). *Fascioloides magna* je u jednotlivých druhů SDH poměrně dobře tolerována, někdy však mohou být

pozorovány snížené hmotnostní přírůstky nebo zhoršená kvalita paroží (Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001). Ke komplikacím, jako je například zánět pobřišnice, dochází však většinou až při silnějších nákazách. Pozorovány byly i infekce s 100 jedinci motolic přítomnými v játrech (Erhardová-Kotrlá, 1971). Některé druhy hostitelů z této skupiny však mohou být citlivější a k úhynu dochází při infekci již několika kusy motolic, např. srnec obecný hyne i při nákazách méně jak 10 kusy motolic (Záhoř, 1965; Erhardová-Kotrlá, 1971).

Motolice se v játrech nalézají v tenkostěnných pseudocystách, tento typ byl také nazván „otevřené pseudocysty“, a to vzhledem k jejich napojení na systém žlučovýchodů (Swales, 1935). Jejich velikost je variabilní, některé dosahují rozměrů dvou až tří centimetrů a jiné velikosti až osm centimetrů (Erhardová-Kotrlá, 1971). Síla stěny je také proměnlivá, v literatuře jsou zaznamenány rozměry 1 – 1,75 mm (Swales, 1935). Stěna pseudocyst je tvořena vazivovým materiálem a lze u ní odlišit dvě vrstvy s jasným přechodem (Swales, 1936; Erhardová-Kotrlá, 1971). Vnitřní vrstva je bohatě celulární, na rozdíl od vnější, která je acelulárními a je tvořena hustě uspořádanými fibrilami pojivové tkáně (Swales, 1936). Touto vazivovou stěnou jsou pseudocysty jasně odděleny od okolní jaterní tkáně (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Přilehlý jaterní parenchym má většinou normální strukturu s mírnou infiltrací eosinofilů (Swales, 1936). V přilehlých portobiliárních prostorech je pozorován detritus a zvýšené množství pojivové tkáně (Swales, 1936). Pseudocysty jsou napojeny na cévní zásobení a systém žlučovýchodů (Swales, 1935, 1936; Erhardová-Kotrlá, 1971). Ve žlučovodech jsou nalézána vajíčka, která se touto cestou dostávají do tenkého střeva. Ve stěnách pseudocyst se také často nalézá deponovaný pigment a vajíčka (Erhardová-Kotrlá, 1971), avšak Swales (1935, 1936) pozoroval, že u hostitelů s pseudocystami napojenými na žlučovody se tohoto pigmentu nachází výrazně méně, protože může odcházet z jater pomocí žlučovýchodů.

V některých pseudocystách byly nalezeny zbytky degenerovaného epitelu žlučovýchodů, což by mohlo podpořit domněnku, že migrující jedinci *F. magna* mohou vniknout do žlučovýchodů, kde následně dojde k jejich opouzdření a vzniku pseudocysty (Erhardová-Kotrlá, 1971; Marinković *et al.*, 2013).

3.4.1.2 Nespecifiční definitivní hostitelé (NDH)

Nespecifiční definitivní hostitelé tvoří okolo invadujících motolic silnostěnné pseudocysty, kterým chybí napojení na systém žlučovýchodů, vajíčka se tedy v naprosté většině případů nedostanou do vnějšího prostředí a nedochází tak k šíření onemocnění (Swales, 1935, 1936).

Mezi NDH patří zejména zástupci hospodářských zvířat: tur domácí (*Bos primigenius f. taurus*), prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*), kůň domácí (*Equus caballus*) nebo u nás volně žijící prase divoké (*Sus scrofa*) (Pybus, 2001).

Vzhledem k tomu, že z těchto hostitelů většinou nejsou do prostředí uvolňována vajíčka, jejich nákaza závisí na výskytu NDH společně s SDH, jejichž prostřednictvím je prostředí

kontaminováno a to buď na společných pastvinách, nebo na plochách určených pro pěstování krmiva, jehož špatným zpracováním posléze může dojít k nákaze NDH přítomnými metacerkáriemi (Swales, 1936; Erhardová-Kotrlá, 1971). Nákaza u skotu probíhá ve většině případů asymptomaticky a je tolerována (Knapp, 1963; Foreyt a Todd, 1976; Conboy a Stromberg, 1991). V některých případech bylo zaznamenáno zejména nechutenství a odmítání potravy a s tím související snížení přírůstku hmotnosti u výkrmných býků (Erhardová-Kotrlá, 1971; Chroustová, 1980).

Motolice jsou v játrech NDH uzavřeny v pseudocystách, které jsou tvořeny silnými vrstvami vaziva o síle 1 – 2,3 cm (Swales, 1935, 1936). Stěna pseudocyst je nepravidelná, jejich okraje vybíhají do okolní tkáně. V některých případech lze ve stěně pseudocyst opět jako u SDH odlišit dvě vrstvy - acelulární a celulární (Swales, 1936). Ve fibrózní stěně pseudocysty je přítomno cévní zásobení, zejména v části přilehlé k jaterní tkáni. Žlučovody ve stěně, ale i v okolní tkáni jsou kompletně neprůchodné kvůli zmnožení vaziva v jejich stěnách. Množství přítomného vaziva je výrazně větší než v případě SDH (Swales, 1936; Pybus, 2001). Vazivová tkáň je totiž, na rozdíl od SDH, kontinuálně tvořena i po enkapsulaci motolic na vnitřní straně pseudocyst tak dochází k zarůstání vajíček do stěn (Swales, 1936). Ve stěnách pseudocyst z býků byla pozorována osifikovaná ložiska, zatímco u jelení zvěře se téměř nevyskytovala (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1976).

Uvnitř pseudocyst se hromadí vajíčka a je zde přítomno i velké množství pigmentu, který nemá jak odcházet do vnějšího prostředí (Swales, 1935; Chroustová, 1980). V literatuře se běžně udává, že u NDH nedochází k uvolňování vajíček do prostředí, nicméně v některých ojedinělých případech byla vajíčka v trusu nalezena (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1974).

Motolice někdy již v průběhu migrace dosáhnou pohlavní dospělosti a produkují vajíčka (Foreyt a Todd, 1976), která díky rozsáhlému poškození jater mohou být zanesena do žlučvodů a dále pak trusem do vnějšího prostředí.

3.4.1.3 Netypičtí hostitelé (NH)

Netypičtí hostitelé se vyznačují absencí enkapsulace motolic hostitelským organizmem, ty díky tomu dlouhodobě migrují po těle hostitele a mohou tak způsobit vážná poškození vnitřních orgánů (Pybus, 2001). Ojediněle byla však pozorována částečná enkapsulace motolice u ovcí (Swales, 1935). Mezi významné NH u nás patří malí přežvýkavci: ovce domácí (*Ovis aries*), koza domácí (*Capra hircus*) (Pybus, 2001). Dále sem můžeme zařadit laboratorní hlodavce, např. morče domácí (*Cavia porcellus*) (Conboy a Stromberg, 1991). Pro tyto hostitele je nákaza *F. magna* většinou letální, k úmrtí dochází často bez předešlých příznaků do čtyř až šesti měsíců po nákaze (Pybus, 2001). V některých případech byla u zvířat před úhynem pozorována slabost, „depresivní stavy“ a ztráta hmotnosti (Foreyt, 1996).

K úhynu hostitele dochází zřejmě v důsledku krevních výlevů vznikajících rupturami cév způsobených migrujícími motolicemi, které hostitelský organizmus není schopen imobilizovat (Foreyt, 1996, 1992). V tělních dutinách se následkem migrace nalézají velké množství pigmentu, abdominální serózy mají na svém povrchu výběžky fibrinového materiálu a také jsou pozorovány srůsty orgánů (Foreyt, 1996).

Migrující motolice jsou u těchto hostitelů nalézány v nejrůznějších částech těla: v játrech, břišní a hrudní dutině, v plicích, v kosterní svalovině v podkoží (Conboy a Stromberg, 1991; Foreyt, 1996). Motolice u tohoto typu hostitele jsou často nalézány ve stádiu pohlavní nezralosti, a tudíž nedochází k produkci vajíček (Foreyt, 1996; Pybus, 2001). Vývoj motolic v těchto hostitelích není retardovaný, k úhynu hostitele však dochází dříve než motolice dospěje. Foreyt a Parish (1990) našel při pitvě po čtyřech měsících od nákazy u ovcí nedospělé motolice, jedna z ovcí však přežila nákazu po dobu osm měsíců, což umožnilo motolicím dosáhnout dospělosti.

Byly pozorovány i případy, kdy byla v trusu ovcí a koz nalezena vajíčka (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Parish, 1990; Novobilský *et al.*, 2007a; Swales, 1936). K uvolnění vajíček z organismu zřejmě také dochází prostřednictvím žlučových cest, kde jich bylo několik kusů nalezeno u přirozeně i experimentálně nakažených ovcí (Swales, 1935; Campbell a Todd, 1954). Z těchto poznatků vyplývá, že se NH mohou v některých případech chovat jako definitivní hostitelé a v omezené míře přispívat k šíření nákazy *F. magna*.

4 Metodika

4.1 Získávání materiálu

4.1.1 Sběr a chov meziphostitelských plžů

Plži *G. truncatula* byli sbíráni v mírně tekoucích vodách České a Slovenské republiky (okolí Příbrami, okolí vodního díla Gabčíkovo). Chováni byli v akváriích a krmeni salátem 3x týdně. Vzhledem k nízké úspěšnosti chovu *G. truncatula* byli v experimentech posléze využíváni plži *Pseudosuccinea columela* (Baldwin Aquatics, Oregon, USA), kteří v akváriích lépe prospívali. V našich experimentech byla larvální stádia získávána převážně z laboratorně infikovaných plžů.

4.1.2 Experimentální nákazy a pítvy plžů

Vajíčka (viz kap. 4.1.3) byla inkubována v Petriho miskách v temnu a při zvýšené teplotě (25 °C), která zkracovala dobu potřebnou pro vývin infekčních stádií (přibližně 14 dní). Po této době byla v Petriho miskách vyměněna voda a líhnutí vajíček bylo indukováno světlem. Poté, co se miracidia začala líhnout, byl obsah misky přelit do Erlenmayerovy baňky, která byla obalena alobalem a v horní části osvětlena. Pozitivně fototaktická miracidia se v horní části koncentrovala a byla poté použita k nákaze plžů umístěných v 96 jamkové destičce. Plži byli miracidii nakažováni 4h a poté pítváni v různých časových intervalech potřebných k získání jednotlivých larválních stádií – sporocysty (3 dny), redie, cercárie. Metacercárie byly získávány ze stěn akvárií s chovanými plži, kde docházelo k jejich encystaci, k pozorování byly také využity metacercárie encystované v průběhu pítvy plžů s vyvinutými cercáriemi.

4.1.3 Dospělci a vajíčka

Vzhledem k tomu, že v laboratorních podmínkách PřF UK nelze chovat vhodné definitivní hostitele *F. magna* (jeleny), byli dospělí jedinci získáváni z jaterní tkáně a pseudocyst odlovené zvěře (viz kap. 4.2.1). Získání červi byli opláchnuti ve fyziologickém roztoku (10 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7,8) a na místě přímo fixováni nebo převezeni k zpracování do laboratoře v kultivačním médiu RPMI 1640 (SIGMA), do kterého byla přidána směs antibiotik s antimykotikem (Penicilin/Streptomycin/Amphotericin B, Biowhittaker[®], LONZA).

V tomto médiu byli dospělí červi schopni přežívat několik dní a do média vylučovali vajíčka. Vajíčka byla získávána také z proplachů napadených jater s následnou dekantací (koncentrací) získané suspenze.

4.2 Tkáň definitivních hostitelů

4.2.1 Přirozeně infikovaní definitivní hostitelé

Vzorky jaterní tkáně, zejména pseudocyst, byly pro histopatologickou studii získávány z odlovené zvěře. V České republice zejména z oblastí Šumavy a Křivoklátska, na Slovensku z oblasti Gabčíkova. Další vzorky byly získány od soukromých chovatelů daňků a hospodářských zvířat (po porážce dobytka na jatkách). Získaná játra byla makroskopicky vyšetřena a vybrané kusy tkáně byly odebrány a fixovány pro další histologické zpracování.

4.2.2 Experimentálně infikovaní definitivní hostitelé

Dva třítýdenní potkaní samci (outbrední, CS, IGS) byli perorálně nakaženi 25 kusy metacerkárií. po 58 a 92 dnech byli potkani utraceni a byla provedena pitva. Získaný materiál byl fixován a dále histologicky zpracován.

4.3 Použité pufrы

PBS pufr

PBS vznikne smícháním roztoku A ($0,2\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$) s roztokem B ($0,2\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$), v takovém poměru, aby bylo dosaženo požadovaného pH. Pro získání pH 7,2 bylo smícháno 360 ml roztoku A se 140 ml roztoku B. Objem roztoku byl poté doplněn destilovanou vodou na 1000 ml. Na závěr bylo do roztoku přidáno 7g NaCl.

Kakodylátový pufr

Kakodylátový pufr byl používán v roztoku fixačního činidla a následně k promývání vzorků při jejich přípravě pro elektronovou mikroskopii.

Pufr o koncentraci 0,1M vznikl rozpuštěním 0,21g kakodylanu sodného (Sigma) v destilované vodě, poté bylo jeho pH zkontrolováno pomocí laboratorního pH metru (WTW inoLab[®] pH level 2).

Fyziologický roztok *G. truncatula*

Při pitvách plžů a k promývání vzorků byl používán roztok, který se složením blížil fyziologickým hodnotám hemolymfy *G. truncatula* (Pullin, 1971).

Pufr vznikl smícháním dvou roztoků (složení viz Tab. 1). Oba roztoky byly namíchány zvlášť, aby nedošlo k vysrážení solí, a poté byl objem získaného roztoku doplněn na 500 ml destilovanou vodou.

Tab. 1: Složení roztoků pro výrobu fyziologického pufru *G. truncatula*

Roztok 1	
NaCl	0,90 g
NaHCO ₃	0,750 g
KHCO ₃	0,122 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,0205 g
Na ₃ PO ₄ · 10H ₂ O	0,0128 g
Glukóza	0,407 g
Destilovaná voda	400 ml
Roztok 2	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,203 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,209 g
Destilovaná voda	50 ml

4.4 Histologické zpracování vzorků

4.4.1 Zalévání do parafínu

Pro histologické studium větších objektů (dospělci, jaterní tkáň) byl použit jako zalévací médium parafín. Na rozdíl od zalévání do JB-4 Plus média se jedná o zdlouhavější proces, při kterém je třeba vzorek řádně odvodnit, což může být zdrojem vzniku artefaktů a před samotným barvením je třeba parafín z tkáně odstranit a opětovně ji zavodnit. Nicméně některé složitější barvicí metody jsou optimalizovány právě pro tkáň zalitou do parafínu (např. trichromy).

Použité chemikálie:

- fixáž - Bouinův roztok (Sigma), 10% formalín pufrovaný CaCl₂
- etanol - 70%, 96%, 100%

- xylen
- nasycená směs xylen/parafín
- parafín (Paraplast Plus, Leica Microsystems)

Postup:

Tkáňové vzorky byly v co možná nejkratším možném čase po pitvě fixovány minimálně po dobu 24 hodin. Pro fixaci materiálu bylo použito dostatečné množství fixáže – 10x větší než byl objem samotného vzorku (10% pufrovaný formalín, Bouinova fixáž). Bouinova fixáž je vhodná hlavně pro přípravu vzorků barvených trichromem. Poté byla fixáž ze vzorků vymývána 70% etanolem, dokud se nepřestala uvolňovat kyselina pikrová. Dále následovalo odvodnění etanolem o vzestupné koncentraci (70%, 96%, 100%) 3x po 30 až 60 minutách, dle velikosti vzorku. Odvodněné tkáně byly projasněny v xylenu 2x po 3/4 doby odvodňování a převedeny do nasycené směsi xylen/parafín. Prosycení vzorků parafínem probíhalo v termostatu při 56 °C. Parafín byl vyměněn po 1 hodině, 12 hodinách a v posledním kroku opět po 1 hodině. Prosycený vzorek byl zalit v silikonové formě a ponechán při pokojové teplotě dokud nebyl dále zpracován. Na mikrotomu (Shandon Finesse ME) byly pomocí kovových čepelek (Thermo Scientific) zhotoveny řezy o tloušťce 4 - 7 μm , poté byly řezy napínány na vodní hladině a po umístění na sklíčko ponechány na předeřáté plotně (55 °C), aby došlo k přilnutí.

4.4.2 Použité barvicí metody pro parafínové řezy

4.4.2.1 Hematoxylin-eosin

Barvení hematoxylin-eosinem (dále jen H&E) patří mezi základní přehledné histologické barvení. Hematoxylin je bazické barvivo, bazofilní substance – např. jádra, se barví v odstínech modré. Eozin je kyselé barvivo barvicí acidofilní struktury - bazické proteiny v buňkách, v cytoplazmě i extracelulárních prostorech (např. kolagen) růžově až do červena. Chrupavky a mukoidní substance se barví světle modře. Existuje několik typů tohoto barvení, přičemž pro naše řezy byl využit Ehrlichův kyselý hematoxylin.

Použité chemikálie:

- xylen
- 75%, 96% a 100% etanol
- destilovaná voda

- Ehrlichův kyselý hematoxylin (viz Tab. 2)
- 1% eosin (Polysciences, Inc.)
- kanadský balzám (Sigma)

Tab. 2: Složení Ehrlichova kyselého hematoxylinu

Hematoxylin	2 g
96% etanol	100 ml
Ledová (koncentrovaná) kyselina octová	10 ml
Glycerín	100 ml
Destilovaná voda	100 ml
KAl (SO ₄) ₂	3 g

Postup:

- Odparafínování: (Každý krok 10 minut)
 - Xylen I
 - Xylen II
- Zavodnění: (Každý krok 2 minuty)
 - 100% etanol
 - 96% etanol
 - 70% etanol
 - destilovaná voda
- Barvení:
 - Kyselý hematoxylin (5 minut)
 - Promývání tekoucí vodou z kohoutku (do zmodrání řezů)
 - Eozin (30 vteřin)
 - Opláchnutí destilovanou vodou
- Odvodnění: (Každý krok 1 minuta)
 - 70% etanol
 - 96% etanol

- 100% etanol
- Projasnění: (1 minuta)
 - Xylen I
- Zamontování do kanadského balzámu

4.4.2.2 Zelený Gomoriho trichrom

Barvení zeleným trichromem je histologická barvicí metoda pro zvýraznění deponovaného kolagenu ve tkáni, který v průběhu různých patologických procesů nahrazuje zdravou funkční tkáň. Pro toto barvení je vhodné, když je tkáň fixovaná v Bouinově roztoku, v případě fixace např. ve formalínu se doporučuje po zavodnění inkubace řezů v předeřhřátém Bouinově roztoku (56 - 60 °C).

Použité chemikálie:

- xylen
- 75%, 96% a 100% etanol
- destilovaná voda
- 1% roztok kyseliny octové (alternativně kyselý etanol)
- Weigertův železitý hematoxylin pracovní roztok
 - Pracovní roztok Weigertova železitého hematoxylinu vznikne smícháním roztoku A a B (složení viz Tab. 3) v poměru 1:1.
- Gomoriho trichrom (složení viz Tab. 4)
- kanadský balzám (Sigma)

Tab. 3: Weigertův železitý hematoxylin – pracovní roztok

Roztok A	
Hematoxylin	1 g
96% ethanol	100 ml
Roztok B	
FeCl ₃	0,6 g
Destilovaná voda	95 ml
HCl	0,75 ml

Tab. 4: Složení Gomoriho trichromu

Chromotrope 2R	0,6 g
Fast Green FCF	0,3 g
Ledová kyselina octová	1 ml
Kyselina fosfowolframová	0,8 g
Destilovaná voda	100 ml

Postup:

- Odparafinování (Každý krok 10 minut)
 - Xylen I
 - Xylen II
- Zavodnění (Každý krok 2 minuty)
 - 100% etanol
 - 96% etanol
 - 70% etanol
 - destilovaná voda
- Barvení
 - Weigertův hematoxylin (10 minut)
 - Promývání vodou z kohoutku za průběžné kontroly pod mikroskopem
 - Gomoriho trichrom (15 minut)
 - Diferenciace v 1% kyselině octové (alternativně v kyselém etanolu)
 - Promytí destilovanou vodou
- Zamontování do kanadského balzámu

4.4.3 Zalévání do JB-4

Pro zpracování larválních stádií i celého hepatopankreatu plže bylo zvoleno zalévací médium JB-4 Plus (Polysciences, Inc.). JB-4 Plus je ve vodě rozpustná glykolmetakrylátová pryskyřice. Mezi její výhody patří výborná prostupnost do tkání a absence odvodňovací etanolové řady při zpracování vzorku, čímž se zabrání smršťování tkáně a pozorované struktury jsou pak lépe zachovány než při zalévání do parafínu.

Použité chemikálie:

- fixáž - Bouinův roztok (Sigma), 4% formalín pufrovaný CaCl_2
- 70% etanol
- JB-4 Plus[®] Embedding Kit (Polysciences, Inc.)
 - infiltrační roztok (složení viz Tab. 5)
 - polymerační - zalévací roztok (složení viz Tab. 6)

Tab. 5: Složení infiltračního roztoku

Množství infiltračního roztoku	Roztok A (Monomer)	Benzoyl peroxid (katalyzátor)
100 ml	100 ml	1,25 μg

Tab. 6: Složení zalévacího roztoku

Objem zalévacího roztoku	Infiltrační roztok	Roztok B (akcelerátor)
50 ml	50 ml	2 ml

Postup:

Materiál byl fixován v Bouinově roztoku nebo v 10% pufrovaném formalínu tak, aby objem fixáže 10x přesahoval objem vzorku. Doba fixace byla minimálně 4 hodiny, aby došlo k úplné fixaci tkáně. Po fixaci následovalo vymytí fixáže 70% etanolem. Zejména u vzorků fixovaných Bouinovým roztokem bylo potřeba etanol měnit opakovaně do té doby než se vymyla kyselina pikrová. Poté byl vzorek ponořen do infiltračního roztoku. Infiltrace probíhala při pokojové teplotě, infiltrační roztok byl měněn za zásobní po 1, 24 a 1 hodině. Po infiltraci byl vzorek opatrně přemístěn do želatinové kapsle odpovídající velikosti a zalit polymeračním

roztokem. Kapsle byla uzavřena tak, aby v ní bylo co nejméně vzduchu a poté byl její obsah stočen v centrifuze (Eppendorf Minispin) tak aby vzorek klesl na dno. Polymerace probíhala při pokojové teplotě po dobu nejméně 24 hodin. Před samotným řezáním byla odstraněna želatinová kapsle a skleněným nožem byly pomocí mikrotomu z kapsle zhotoveny řezy o síle 2 - 5 μm . Používány byly jen čerstvé řezy, u starších řezů docházelo ke změnám ve výsledcích barvení.

4.4.4 Použité barvicí metody pro řezy v JB-4

Řezy zalité v médiu JB-4 Plus lze barvit okamžitě bez nutnosti odstraňování zalévacího média. Obarvené řezy se následně zamontují pomocí montovacího média DPX (Sigma).

4.4.4.1 Hematoxylin - eosin

Použity byly 2 druhy hematoxylinů Ehrlichův kyselý a Gillův. Pro rutinní barvení byl používán kyselý Ehrlichův hematoxylin. Gillův hematoxylin byl použit k dobarvení jader při barvení PAS reakcí.

Použité chemikálie:

- Ehrlichův kyselý hematoxylin
- 1% eosin (Polysciences, Inc.)
- destilovaná voda
- DPX montovací médium (Sigma)

Postup barvení:

Na JB-4 řezy byl aplikován Ehrlichův kyselý hematoxylin po dobu 2 minut. Obarvené řezy byly propláchnuty vodou z vodovodu do zmodrání řezů. Dále byly řezy barveny 30 sekund eosinem a posléze opláchnuty destilovanou vodou. Obarvené řezy byly zamontovány pomocí DPX média.

4.4.4.2 PAS

PAS (Periodic acid shift) reakce je základní reakcí průkazu polysacharidů. Podstatou PAS reakce je oxidace polysacharidů, při které vznikají aldehydy, jež reagují se Schiffovým reagens za vzniku fialově červeného zbarvení.

Použité chemikálie:

- 1% kyselina jodistá (H_5IO_6)
- Schiffovo činidlo (Merck)
- promývací činidlo (složení viz Tab. 7)
- Gillův hematoxylin (složení viz Tab. 8)
- DPX montovací médium (Sigma)

Tab. 7: Složení promývacího činidla

10% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$	2 ml
Destilovaná voda	100 ml
Koncentrovaná HCl	0,5 ml

Tab. 8: Složení Gillova hematoxylinu

Hematoxylin	4 g
Destilovaná voda	730 ml
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	250 ml
Etylen glycol	35 g
Kyselina octová	20 ml
NaIO_3	0,4 g

Postup:

Řezy byly inkubovány 20 minut s 1% kyselinou jodistou a opláchnuty destilovanou vodou. Následně byly inkubovány s Schiffovým činidlem po dobu 30 minut a poté proplachovány destilovanou vodou 20 minut, na propláchnuté řezy bylo ještě 3x po dobu 2 minut aplikováno promývací činidlo. Jádra na řezech byly dobarveny Gillovým hematoxylinem (5 minut).

4.4.4.3 Toluidinová modř

Toluidinová modř je bazické barvivo, které barví jádra tmavě modře. Některé struktury (např. granula mastocytů) se barví v jiné barvě než je základní odstín, tento jev se nazývá metachromasie.

Použité chemikálie:

- Toluidinová modř (Polysciences, Inc.)
- 1% roztok tetraboritanu sodného
- destilovaná voda

Příprava Toluidinové modři

1% roztok tetraboritanu sodného a 1% roztok toluidinové modři (Polysciences, Inc.) se smíchá v poměru 1:1 a před prvním použitím se roztok přefiltruje přes filtrační papír.

Postup barvení

Řezy byly barveny toluidinovou modří po 30 vteřin a poté byly opláchnuty proudem destilované vody až do vymytí přebytečného barviva. Po oschnutí byly řezy zamontovány do média DPX.

4.5 Fluorescenční značení protilátkami

Pomocí protilátek proti alfa tubulinu byly značeny ciliární senzorické struktury u jednotlivých larválních stádií a získané výsledky byly porovnány s výsledky ze skenovací elektronové mikroskopie.

Použité chemikálie:

- fixáž - 4% paraformaldehyd v 0,1M PBS
- proplachovací roztok AbD (antibody dilution buffer) ([Mair *et al.*, 1998](#)) (složení viz Tab. 9)
- 1% SDS (sodium dodecyl-sulphate, Sigma) v 0,1M PBS
- primární protilátka - ředění 1:100 (Monoclonal Anti-acetylated Tubulin antibody produced in mouse, Sigma)
- sekundární protilátka – ředění 1:100 (Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Mouse IgG, Invitrogen)
- montovací médium VECTASHIELD[®] Mounting médium (Vector Laboratories)

Tab. 9: Složení AbD

BSA (Bovine serum albumin, Sigma)	1%
Triton TM X-100 (Sigma)	0,1%
PBS pH 7,4	0,1M
NaN ₃	0,01%

Postup:

Vzorky byly fixovány 4% paraformaldehydem v 0,1M PBS přes noc. Po fixaci byly vzorky promývány 1 hodinu promývacím roztokem AbD. Roztok byl v průběhu promývání minimálně 3x vyměněn za zásobní. Promyté vzorky byly 1 hodinu nebo alternativně přes noc inkubovány v 1% roztoku SDS. Následovala 1,5 hodinová inkubace vzorků na ledu s primární protilátkou, v ředění 1:100. Po inkubaci byly vzorky promyty 3x po 5 minutách roztokem AbD a inkubovány 1,5 hodiny v temnu se sekundární protilátkou opět v ředění 1:100. Vzorky byly poté promyty 3x po 5 minutách a zamontovány do média Vectashield. Kontrolní vzorky byly zpracovány stejně, kromě kroku inkubace s primární protilátkou, který byl vynechán.

Vzorky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 51 a také pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2. Získané fotografie byly dále zpracovávány v programu ImageJ 1.47v.

4.6 Impregnace stříbrem

Impregnace stříbrem byla použita pro vizualizaci senzorických struktur na povrchu miracidíí. Tato metoda umožňuje lokalizaci těchto struktur i přes silnou ciliaturu nacházející se na povrchu miracidíí.

Postup

Suspenze zkoncentrovaných miracidíí byla umístěna na hodinové sklíčko a Pasteurovou pipetou k ní byl přidán přibližně stejný objem roztoku 2% AgNO₃. Hodinové sklíčko se vzorkem bylo nejprve 10 minut ponecháno ve tmě, poté byl vzorek opakovaně promyt vodou a posléze na 10 minut vystaven přímému osvětlení 20 W žárovkou. Takto zpracované vzorky byly přeneseny na podložní sklíčko a pozorovány světelným mikroskopem Olympus BX 51.

4.7 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

4.7.1 Příprava vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)

Pro detailní studium povrchových struktur všech stádií *F. magna* byl využit skenovací elektronový mikroskop.

Použité chemikálie:

- fixáž - horký 4% formaldehyd, 2,5 glutaraldehyd v 0,1M kakodylátovém pufru pH 7,2 až 7,4
- 0,1M kakodylátový pufr
- 1 – 2% oxid osmičelý (OsO_4)
- 50%, 70%, 96%, 100% etanol
- 100% aceton

Postup

Vzorky byly fixovány v 4% horkém formaldehydu, který způsobuje jejich napnutí nebo 2,5% glutaraldehydu v 0,1M kakodylátovém pufru po dobu minimálně 2 hodin. Po fixaci následovalo promytí vzorku v kakodylátovém pufru 3x 15 minutách. Promyté vzorky byly následně 1 hodinu postfixovány v 1- 2% roztoku oxidu osmičelého v 0,1M kakodylátovém pufru. Postfixace osmiem není pro přípravu těchto preparátů nezbytná, nicméně byla použita, protože při ní dochází ke zpevnění povrchu vzorku a navíc zčernání povrchu přispívá k jeho lepší viditelnosti, což ulehčuje manipulaci se vzorkem. Osmium bylo po postfixaci důsledně vymyto pufrem a vzorky byly přes vzestupnou alkoholovou řadu a aceton odvodněny dle schématu:

- 50%, 70%, 80%, 96% etanol - 10 minut
- 100% etanol - 3 x 5 minut
- 100% aceton - 3 x 5 minut

V případě přípravy vzorků sonikovaných miracidii byl vzorek ve 2. kroku, kdy se nacházel ve 100% etanolu, vložen v mikrozkmavce do vodní lázně v ultrazvukové lázni ELMA CLEAN BOX (P-LAB) a sonikací (45 kHz) zbavován ciliatury za průběžné kontroly ve světelném mikroskopu Olympus BX 51.

Odvodněné vzorky byly zabaleny do cigaretového papíru, a v něm umístěny do vzorkovnice s acetonem, aby došlo k zabránění vysušení. Další zpracování probíhalo v laboratoři elektronové mikroskopie (LEM) PřF UK. Metodou kritického bodu pomocí kapalného CO₂ v přístroji Bal-Tec CPD 030 byly vzorky vysušeny. Následně byly vzorky orientovány pomocí řasy na kovový terčík a pokoveny 1 nm vrstvou zlata v napravovacím zařízení Bal-Tec SCD 050. Hotové preparáty byly pozorovány na elektronovém mikroskopu JEOL 6380 LV.

4.7.2 Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Pro pozorování ultrastruktury jednotlivých vývojových stádií byla použita transmisní elektronová mikroskopie. Vzhledem k špatné prostupnosti vaječných a metacerkariálních obalů, kdy nedošlo k zachování vnitřních struktur, byla kromě klasických postupů přípravy vyzkoušena i metoda mrazové substituce.

4.7.2.1 Zpracování preparátů při použití chemické fixace

Použité chemikálie:

- fixáž – 2, 5% glutaraldehyd v 0, 1M kakodylátovém pufru
- 1 – 2% oxid osmičelý (OsO₄)
- 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% etanol
- 100% aceton
- pryskyřice Spurr (SPI-ChemTM)

Postup:

Získané vzorky byly ihned po odebrání fixovány, nejvíce se osvědčil 2,5% glutaraldehyd v 0,1M kakodylátovém pufru. Vzorky byly fixovány nejméně 2 hodiny, pokud byl materiál fixován přes noc, tak fixace probíhala při 4 °C. Posléze následovalo promývání vzorků (3x 15 minut) ve stejném pufru, který byl použit ve fixáži. Promyté vzorky byly poté 1 hodinu postfixovány 1-2% oxidem osmičelým. Postfixace osmiem přispívá i ke kontrastování membrán. Po tomto kroku byly vzorky opět 3x 5 minut promývány kakodylátovým pufrem a přes etanolovou řadu a aceton odvodněny a převedeny do pryskyřice dle schématu.

30%, 50%, 70% etanol	15 minut
80%, 96% etanol	5 minut
100% etanol	3 x 5 minut
100% aceton	3 x 5 minut

Prosycení vzorků směsí acetonu a pryskyřice

aceton : pryskyřice

3 : 1 2 hodiny

1 : 1 4 hodiny

1 : 3 6 - 12 hodin

Následně byly vzorky převedeny do čisté pryskyřice, která byla vyměněna celkem 3x po 12 hodinách, vše při pokojové teplotě. Pryskyřicí prosycené vzorky byly přeneseny do BEEM kapslí (SPI Supplies) a zality čistou pryskyřicí (kromě dospělců, ti byli zaliti v silikonové formě). Beem kapsle byly poté umístěny do mikrozkmavek a zcentrifugovány tak, aby vzorky klesly na dno kapsle. Zalité vzorky byly poté umístěny na 48 hodin do termostatu (60 °C), kde došlo k jejich polymeraci.

Zpolymerované bločky byly dále zpracovány v LEM, kde byly na ultramikrotomu zhotoveny ultratenké řezy. Ultratenké řezy byly kontrastovány 20 minut 3% octanem uranylu a citrátem olovnatým. Hotové ultratenké řezy byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1011.

4.7.2.2 Zpracování preparátů při použití “High pressure freezing” a kryosubstituce

Pomocí této metody byla zpracována vajíčka a metacerkárie. Vzorky byly předány v nefixovaném stavu - v odstáté vodě z kohoutku k dalšímu zpracování v laboratoři Elektronové mikroskopie v Parazitologickém ústavu akademie věd v Českých Budějovicích. Zde byly vzorky zpracovány pomocí metod “High pressure freezing”, mrazové substituce a následně převedeny do pryskyřice Epon.

Postup:

Vzorky byly zamrazeny ve vysokotlakém mrazicím systému Leica EM PACT2 zalité v kryoprotektantu (20% BSA). Mrazová substituce probíhala v přístroji LEICA EMAFS v roztoku média složeného z 2% osmia ve 100% acetonu. Vzorky byly substituovány v několika mezystupních (hodnoty T) s periodami zvyšujících se teplot o hodnotu S v intervalu 1 hodiny.

Program substituce: T1: -90°C 96hodin

S1: 5°C 14hodin

T2: -20°C 24hodin

S2: 3°C 8hodin

T3: 4°C 18hodin

Poté byly vzorky již za pokojové teploty promyty 3x 15 minut ve 100% acetonu a infiltrovány směsí pryskyřice Epon dle schématu.

Aceton : pryskyřice

2 : 1 1 hodina

1 : 1 1 hodina

1 : 2 1hodina

Vzorky byly převedeny do 100% pryskyřice přes noc a posléze zality a polymerovány v termostatu při 62 °C. Hotové bločky se vzorky byly dále klasicky zpracovány LEM v Praze a prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1011.

5 Výsledky

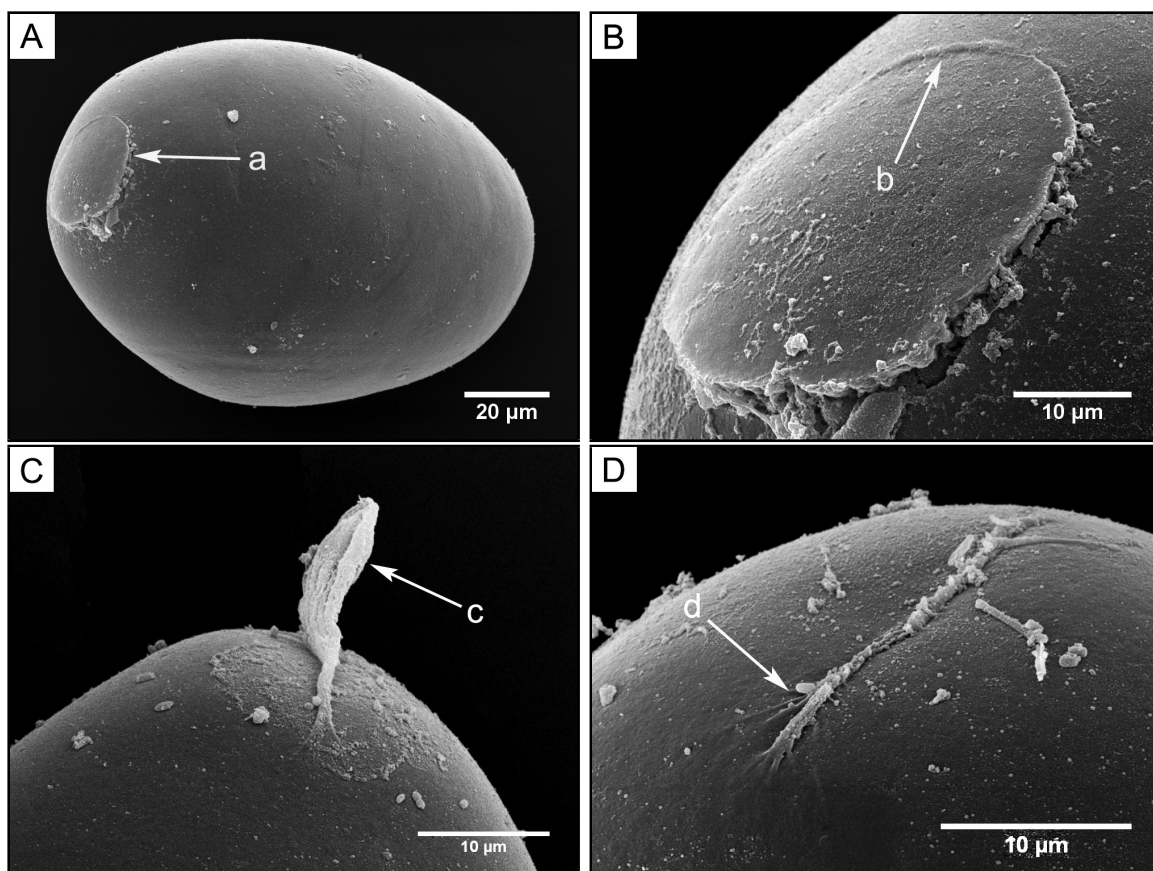
5.1 Morfologie vývojových stádií

5.1.1 Vajíčko

Získaná vajíčka byla oválného tvaru a ve světelném mikroskopu měla zlatavě hnědou barvu, přes stěnu vajíčka prosvítal jejich obsah. Průměrná velikost vajíček byla $154 \times 96 \mu\text{m}$ ($n = 140$). Na širším konci vajíček se nacházelo víčko (operkulum) (Obr. 9 A,B). Povrch vajíček pozorovaný SEM byl rovný a hladký (Obr. 9 A), občas byly pozorovány drobné nerovnosti, kdy se jednalo zřejmě pouze o nečistoty, které ulpěly na povrchu pravděpodobně v průběhu zpracování objektu. Spoj těla vajíčka s víčkem byl mírně vyvýšen (Obr. 9 B), na povrchu víčka se také vyskytovaly malé prohloubeniny. Průřez spojením víčka s vajíčkem se pomocí TEM nepodařil zachytit, pomocí SEM bylo pozorováno, že víčko mělo vroubkovaný okraj (Obr. 9 B). Na aboperkulárním konci některých vajíček byly ve světelném mikroskopu pozorovány bezbarvé výběžky. Na tyto výběžky se často zachytávaly nečistoty, a proto při pozorování nabývaly různých tvarů. Při detailní analýze pomocí SEM bylo zjištěno, že se jedná o výběžky stěn vajíčka (Obr. 9 C), po jejichž odlomení byla pozorovatelná „jizva“ (Obr. 9 D). Vajíčka s těmito výběžky byla pozorována i v suspenzi materiálu získaného po výplachu pseudocyst, ale především na vajíčkách získaných přímo z uteru dospělých motolic. Vajíčka získaná z proximálních klíček uteru se také lišila od vykladených vajíček světlou barvou skořápky.

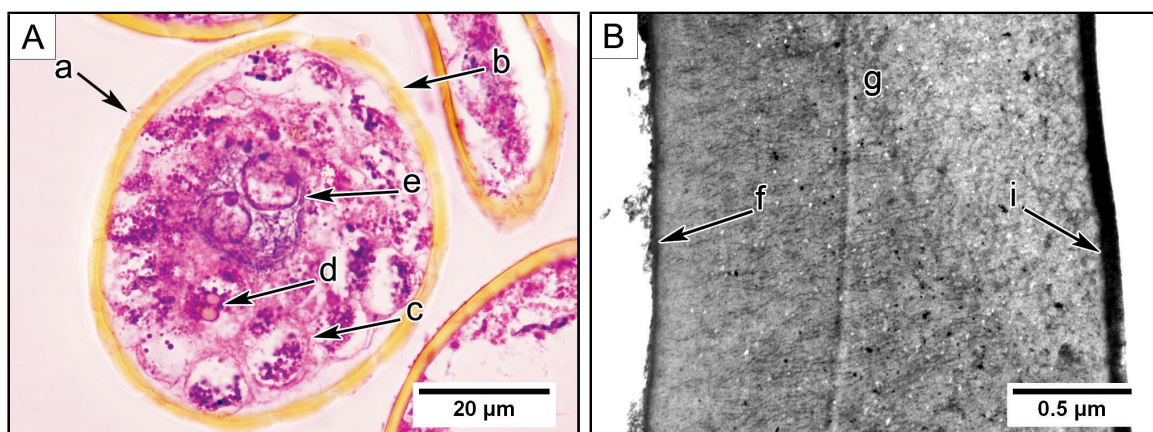
Obsah vajíček byl zkoumán pomocí histologie a TEM, a to jak u neembryonovaných vajíček především z jaterních pseudocyst, tak na histologických řezech uteru dospělé. Naprostá většina vnitřních struktur však nebyla zachována. Pomocí TEM byly ve $3 \mu\text{m}$ silné vaječné stěně odlišeny 3 vrstvy o různé elektronové denzitě (Obr. 10 B). Prostřední vrstva byla nejsilnější a měla retikulární strukturu. Okrajové vrstvy byly tenčí, vnější byla silně elektrondenzní o síle zhruba $0,1 \mu\text{m}$, vnitřní vrstva na některých preparátech nebyla zřetelná.

Na několika částečně zachovaných vajíčkách byly pozorovány i vnitřní struktury. Zygota byla ve vajíčku obklopena velkým počtem - zhruba 30 až 40 vitelinních buněk (Obr. 10 A). V cytoplazmě vitelinních buněk bylo pomocí TEM pozorováno velké množství membránou ohraničených vezikul obsahujících zásobní polysacharidy. V několika případech byly ve vajíčku pozorovány i nevyužité zbytky prekurzorů vaječné stěny (Obr. 10 A).



Obr. 9: Povrchové struktury vajíček (SEM)

A: Celkový pohled. B: Detail operkula. C, D: Aboperkulární konec vajíčka. a – operkulum, b – vyvýšený okraj operkula, c – výběžek, d – „jizva po odlomeném výběžku“

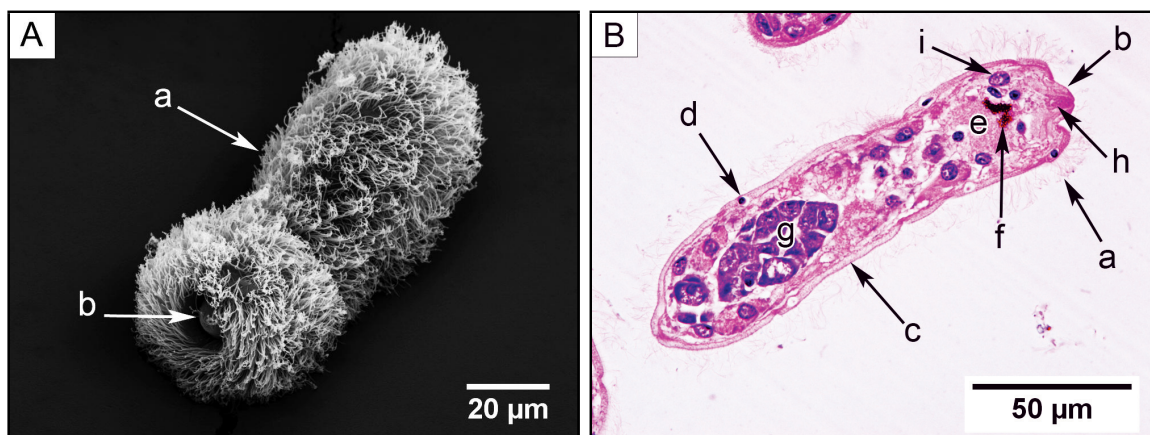


Obr. 10: Vnitřní struktury vajíček

A: Podélný řez vajíčkem (H&E). B: Ultrastruktura vaječné stěny (TEM). a – stěna vajíčka, b – operkulum, c – vitelinní buňky, d – zbytky prekursorů vaječné stěny, e – zygota, f – vnitřní vrstva, g – střední vrstva, i – vnější vrstva

5.1.2 Miracidium

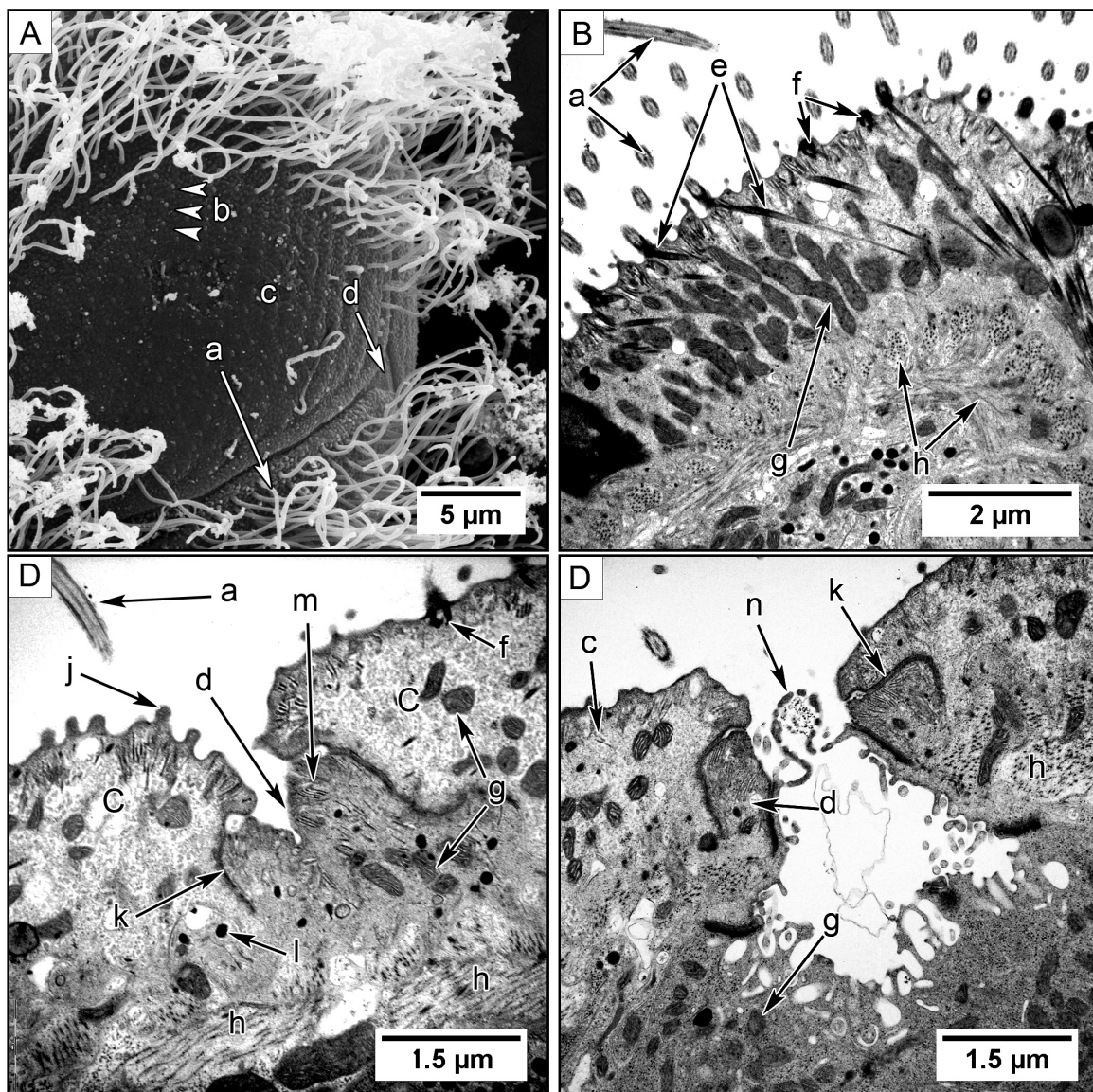
Získaná miracidia se aktivně pohybovala ve vodním prostředí, kde vykazovala výrazně pozitivní fototaxi. Vzhledem k neustálým kontrakcím těla byly naměřené rozměry miracidí výrazně variabilní - 110 – 160 μm ($n = 30$). Povrch miracidia byl, až na oblast terebratoria, kryt 21 ciliárními (epiteliálními) destičkami. Uspořádání jednotlivých destiček bylo pozorováno na miracidích, kterým byly sonikací odstraněny cilie (Obr. 12 A), které jinak hustě kryly povrch (Obr. 11 A, B; 12 A) a na preparátech impregnovaných stříbrem, které se vázalo na okraje destiček (Obr. 14 B). Destičky byly uspořádány v pěti řadách, od přední části těla, následovně: 6, 6, 3, 4, 2. Jejich počet byl konstantní u všech pozorovaných jedinců. Ciliární destičky měly jedno jádro lokalizované periferně, toto jádro mělo kulatý nebo také zploštělý tvar (Obr. 11 B). Na sonikovaných miracidích bylo také zřetelně viditelné pravidelné uspořádání jednotlivých cilií na destičkách, a to v podélných řadách (Obr. 12 A).



Obr. 11: Miracidium stavba těla

A: Povrch miracidia (SEM). B: Miracidium podélný řez (H&E). a – cilie, b - apikální papila, c - ciliární destičky, d – jádro ciliární destičky, e - hlavové ganglium, f - oční skvrna, g – zárodečné buňky, h – apikální žláza, i – jádro laterální žlázy.

Cilie měly klasickou ultrastrukturu 9 + 2 párů mikrotubul, které byly do těla destičky ukotveny pomocí bazálního tělíska (Obr. 12 B, C). Tento aparát byl dále ukotven pomocí fibril probíhajících příčně tělem destičky (Obr. 12 B). Při barvení toluidinovou modří se vnější povrch destiček barvil metachromaticky, což svědčilo o přítomnosti kyselých mukopolysacharidů. Pomocí PAS se nejvýrazněji barvily zadní řady destiček. Na ultrastruktuře bylo uvnitř destiček pozorováno velké množství mitochondrií (zejména v první řadě destiček) (Obr. 12 B) a glykogenu (v zadních řadách). Povrch destiček mezi jednotlivými ciliemi vybíhal v podobě drobných prstovitých výběžků (Obr. 12 C). Mezi jednotlivými destičkami se nacházely mezi-buněčné valy napojené skrz bazální laminu a dvě vrstvy svaloviny na těla subtegumentálních buněk (Obr. 11 D). S destičkami byly spojeny pomocí žíhaných desmozomů (Obr. 12 C).



Obr. 12: Ciliární destičky a mezibuněčné valy

B: Uspořádání cilií v podélných řadách (SEM). B: Podélný řez ciliární destičkou v přední části těla miracidia (TEM). C: Mezibuněčný val (TEM). D: Exkreční pór (TEM). a – cilie, b – odlomené cilie, c – ciliární destička, d – mezibuněčný val, e – kotvicí fibrila, f – bazální tělísko, g – mitochondrie, h – svalovina, i – subtegumentální buňka, j – výběžek, k – desmozom, l – granula subtegumentálních buněk, m – membranózní tělíska, n – fenestrovaná blanka.

V cytoplazmě valů se nacházely mitochondrie a kulatá elektrondenční granula a množství membranózních tělísek. V několika případech bylo zdokumentováno zplošťování těchto granul. Těla subtegumentálních buněk obsahovala jádro, výrazné cisterny endoplazmatického retikula a velké množství elektrondenčních tělísek, která byla v menším množství pozorována v mezibuněčných valech. V mezibuněčných valech (před poslední řadou destiček) se také nacházelo vyústění exkreční soustavy (Obr. 12 D). Exkreční soustava byla tvořena párem plaménkových buněk, od kterých vedly dukty do zadní části těla, kde ústily v podobě exkrečních pórů, které byly kryté fenestrovanou blankou (Obr. 12 D). V zadní části těla se také nacházel shluk zárodečných buněk (Obr. 11 B) obklopený výběžky buněk, jejichž cytoplazma obsahovala značné množství mitochondrií, lipidických kapének a glykogenu.

Apikální papila

Apikální papila je zatažitelný orgán v přední části těla miracidia, jehož povrch pokrývala pouze zvrásněná vrstva cytoplazmatické membrány, destičky v této části těla nebyly přítomny (Obr. 13; 14 A). Na povrchu papily byly pomocí impregnace stříbrem a SEM pozorovány senzorické struktury a vyústění žláz (Obr. 14 A, B). Pomocí histologických barvicích metod a TEM byly odlišeny dva typy těchto žláz: apikální a laterální.

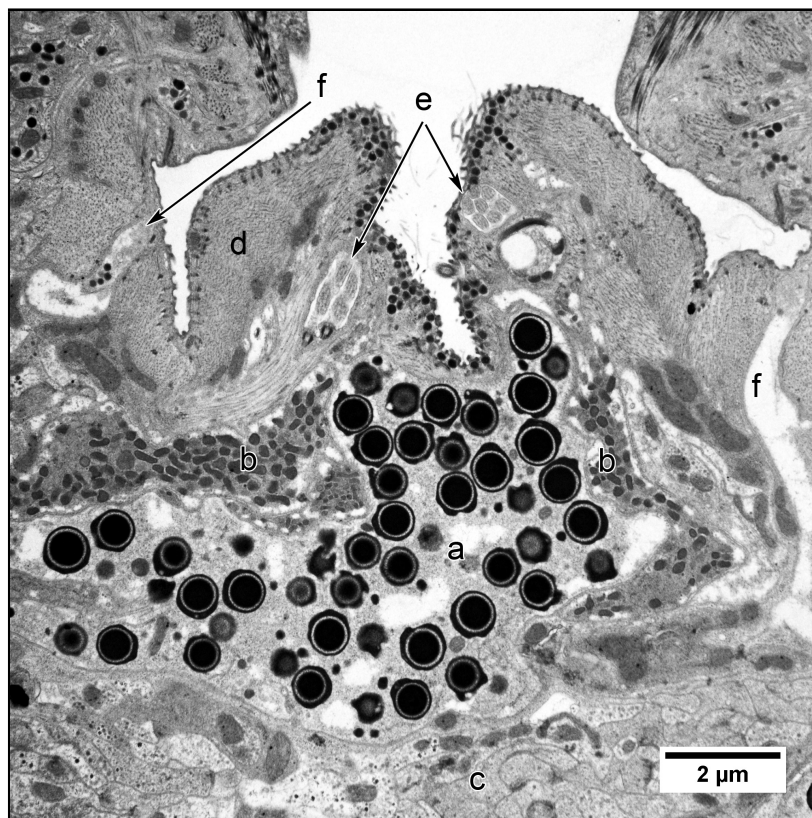
Apikální žláza

Apikální žláza vyplňovala prostor mezi vrcholem apikální papily a hlavovým gangliem (Obr. 13). Byla tvořena velkým mikrotubuly vyztuženým syncitiem, ve kterém se na jeho bázi nacházela tři až čtyři velká kulatá jádra. Granulární obsah apikální žlázy se barvil H&E eosinofilně (Obr. 11 B). Pomocí TEM byly odlišeny dva typy granul (Obr. 13). Menší membránou vázaná elektrondenční granula ($0,15\ \mu\text{m}$) byla často nacházena v několika vývodních duktech ústících pod povrch terebratoria, kde byla rozmístěna v jedné vrstvě (Obr. 13; 15 A). Druhým typem byla velká ($0,7\ \mu\text{m}$), taktéž membránou vázaná granula, u nichž byly pozorovány tři vrstvy o rozdílné elektronové denzitě (Obr. 13).

Laterální žlázy

Po stranách apikální žlázy se nacházel pár podlouhlých, směrem k vyústění na apikální papile se zužujících, buněk (Obr. 13). Na některých řezech se zdálo, že by tento pár mohl být zdvojený. Na bázi buněk bylo lokalizováno jedno velké oválné jádro přibližně v úrovni prvního mezibuněčného valu (Obr. 11 B). Z histologických barviv se jejich obsah barvil pouze pomocí PAS reakce. V cytoplazmě těchto buněk se nacházelo velké množství oválných podlouhlých elektrondenčních granul bikonkávního tvaru o délce zhruba $0,35\ \mu\text{m}$ a šířce $0,1\ \mu\text{m}$ (Obr. 13). Cytoplazma těchto buněk byla výrazně elektrondezní.

Vyústění žlázových buněk bylo pomocí SEM pozorováno na středu apikální papily (Obr. 14). Jednotlivé vývody byly ohraničené nízkým límcem a vyskytoval se zde sekreční materiál. Další typ vyústění byl pozorován na bázi apikální papily mezi svalovinou (Obr. 13). V těchto duktech vyztužených mikrotubuly se vyskytovala granula podobná těm nacházejícím se v subtegumentálních buňkách.



Obr. 13: Ultrastruktura apikální části miracidia - podélný řez (TEM) a - apikální žláza, b - laterální žlázy, c - hlavové ganglium, d- svalovina, e - multiciliární papily, f - vyústění žlázových ductů.

Senzorické struktury

Za těly žlázových buněk bylo pozorováno masivní hlavové ganglium (Obr. 12 B, 13), pomocí TEM bylo pozorováno jeho napojení na receptorové orgány.

Nejvýraznějším receptorem byla pigmentová oční skvrna v přední části těla (Obr. 11 B; 14 B). Pomocí impregnace stříbrem se na apikální papile značily senzorické papily společně s vývody žlázových buněk, jejichž počet se nicméně tímto způsobem nepodařil určit (Obr. 14 B). Dále se touto metodou v mezibuněčných valech mezi první a druhou řadou ciliárních destiček značilo dalších šest papil. Pomocí TEM byl dále na řezech odhalen jeden

pár vnitřních receptorů.

Oční skvrna

Oční skvrna se nacházela v přední části těla miracidia a byla tvořena tmavými granuly uspořádanými do podoby dvou k sobě přiléhajících čoček mističkovitého tvaru (Obr. 11 B; 14 B, 15 D). Každá čočka byla tvořena jednou buňkou, v jejíž cytoplazmě se nacházela výše zmíněná granula, která měla nepravidelný tvar a elektrondenzní charakter, dále se zde nacházelo malé množství mitochondrií (Obr. 15 C). V konkávní části byl povrch čočky v kontaktu s buňkou, jejíž přilehlá cytoplazmatická část vybíhala do četných záhybů, v distální části této buňky se nacházelo její jádro a velké množství mitochondrií.

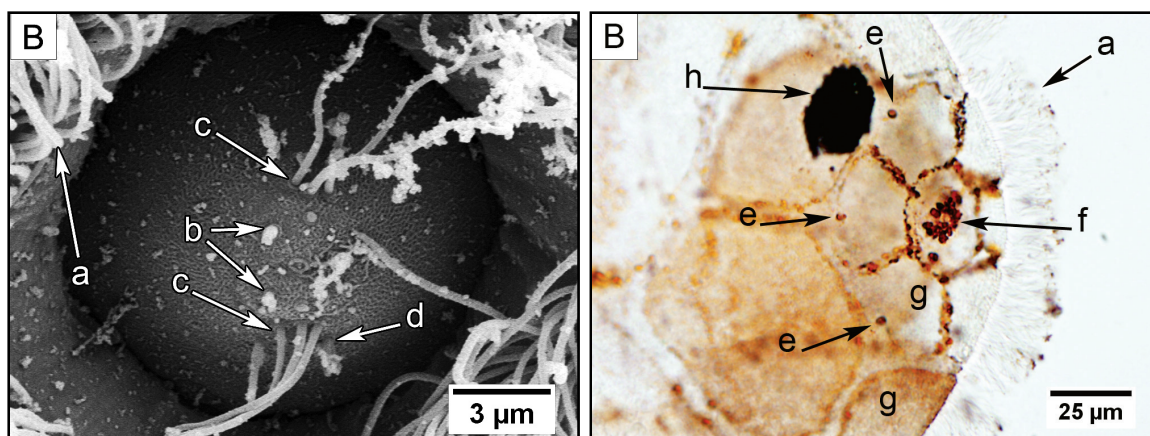
Senzorické struktury na apikální papile

Senzorické struktury na apikální papile měly ciliární základ, a to buď ve formě samostatných cilií, nebo jejich skupin. Celkové uspořádání papil bylo osově souměrné (Obr. 14 A, B). Pomocí stříbrnění se počet jednotlivých papil nepodařil určit, jelikož od sebe jednotlivé papily nebylo možné rozpoznat, protože byly nahloučeny těsně u sebe a zároveň se touto metodou značilo i vyústění žlázových buněk (Obr. 14 B). Pomocí SEM se také přesné rozložení ciliárních papil nepodařilo určit, protože se jednotlivé cilie překrývaly a byly znečištěny produkty žlázových buněk, s jejichž vývody také mohlo dojít k záměně (Obr. 14 A). Uprostřed papily byly pozorovány čtyři vývody žlázových buněk ohraničených límcem. Nejblíže k nim se nacházela na každé straně řada tří samostatných dlouhých cilií, každá s vlastním tegumentálním límcem. Za nimi byly pozorovány další cilie, jak jednotlivé tak i seskupené v podobě multicilární papily.

Pomocí TEM se na několika řezech podařilo zachytit příčný řez multicilární papilou (Obr. 15 A). Na řezech bylo patrných sedm cilií. Dále byla pozorována ultrastruktura jednotlivých typů papil. Jednotlivé papily byly napojeny na nervové zakončení vedoucí z hlavového ganglia, u báze se nacházel nervový měchýřek s neurosekretorickými vezikulami.

Papily na bázi ciliárních destiček (laterální papily)

Pomocí impregnace stříbrem se značilo šest struktur na bázi prvních šesti ciliárních destiček (Obr. 14 B). Pomocí SEM jejich charakterizace nebyla možná, jelikož se nacházely mezi bohatou ciliaturou, kterou se v této oblasti nedařilo odstranit ani sonikací. Popis těchto struktur se zdařil až pomocí TEM (Obr. 15 B). Tento typ papily byl ukotven pomocí desmozomů v mezibuněčném valu těsně u báze první řady destiček. Nervové zakončení mělo podobu měchýřku obsahujícího četné oválné vezikuly. Externí část papily byla tvořena cilií s klasickým uspořádáním mikrotubul 9+2 ukotvenou pomocí bazálního tělíska. Cilie byla v celé



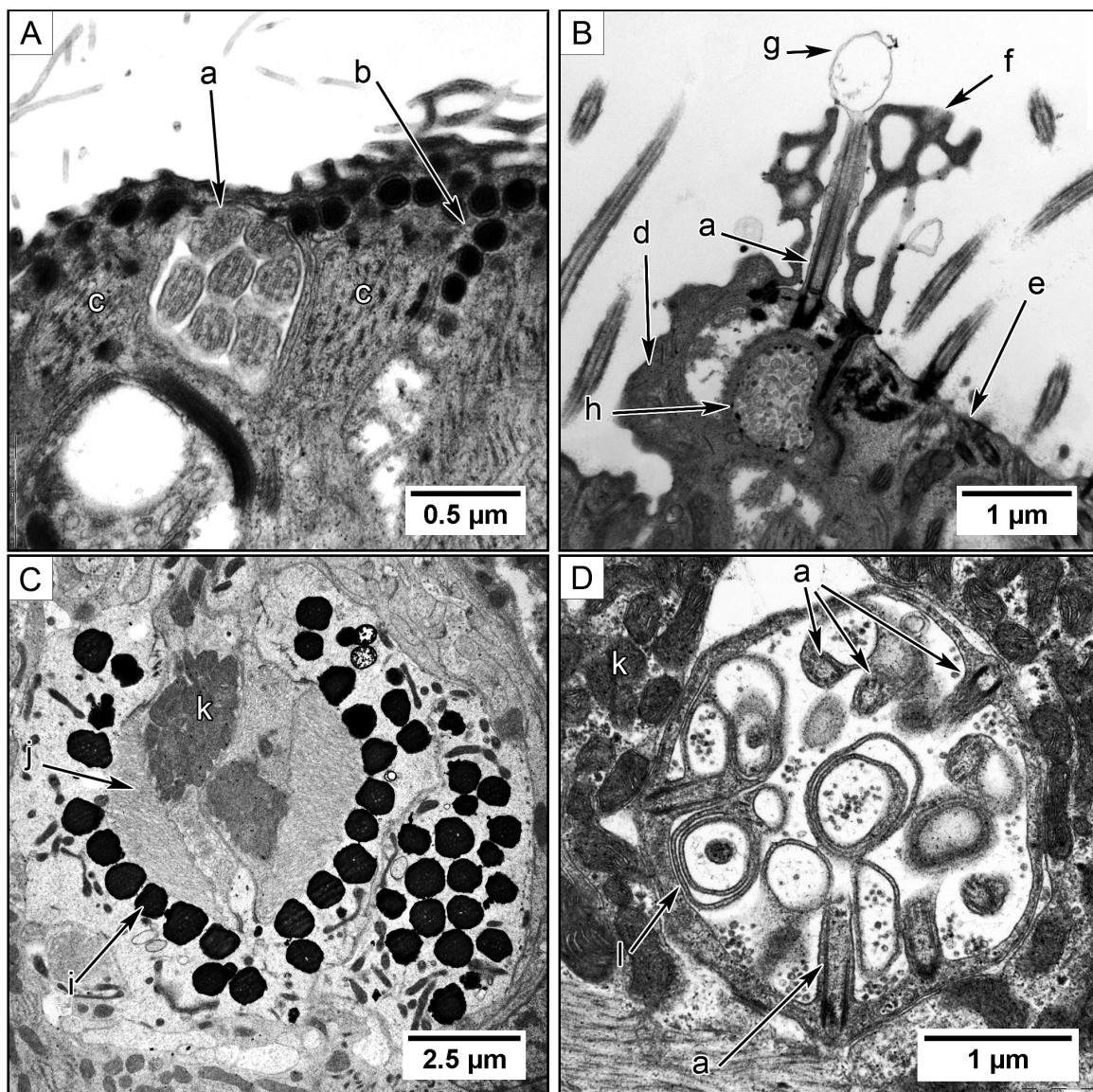
Obr. 14: Senzorické struktury a vyústění žláz v apikální části miracidia

A: Apikální papila detail (SEM) B: Rozmístění senzorických a vyústění žlázových struktur (metoda stříbření). a – cilie, b – vyústění žláz, c – ciliární papily, d – multiciliární papila, e – papily v mezibuněčných valech, f – vyústění žláz a papily, g – ciliární destičky, h – oční skvrna.

své délce obklopena členitými výběžky cytoplazmy. Na jejím konci přesahujícím obal se vyskytovala měchýřkovitá membranózní struktura, která obsahovala vezikuly. Výjimečně bylo pozorováno toto měchýřkovité zakončení i na histologických řezech.

Vnitřní multiciliární papila

Tento typ, pravděpodobně párového receptoru, byl identifikován pouze pomocí TEM. Nacházel se ve dvojici uvnitř těla pod svalovinou, zhruba na úrovni mezibuněčného valu mezi první a druhou řadou ciliárních destiček. Receptor měl podobu váčku, v jehož vnitřní obvodové stěně bylo pomocí bazálních tělísek ukotveno osm krátkých ciliárních struktur (Obr. 15 D). Tyto cilie měly modifikované uspořádání mikrotubul, v podobě 9+0 - nacházely se u nich pouze obvodové dvojice mikrotubul, středové nebyly přítomny. S každou cilií byl asociován stočený výběžek jeho vnitřní stěny tvořený dvěma vrstvami plazmatické membrány. V těchto záhybech, ale i v lumen měchýřku byly pozorovány četné kulovité elektronlucentní vezikuly.



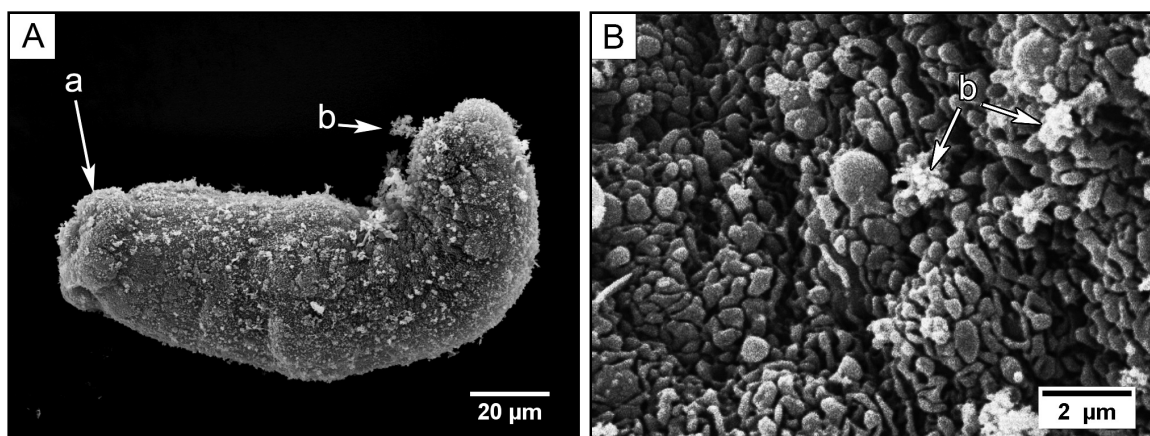
Obr. 15: Ultrastruktura senzorických struktur (TEM)

A: Řez terebratoriem s průřezem multiciliární papily. B: Laterální papila. C: Oční skrvna. D: Vnitřní multiciliární papila. a – cilie, b – dukt s granuly apikální žlázy, c – svalovina, d – mezibuněčný val, e – ciliární destička, f – cytoplazmatický výběžek, g – zakončení papily, h – nervové zakončení, i – pigmentová granula, j – záhyby cytoplazmatické membrány, k – mitochondrie, l – lamelární výběžky, m – vezikula.

5.1.3 Sporocysta

Sporocysty byly získávány pro studium pitvami plžů 3.dpi. Tělo sporocyst bylo světlé barvy a jeho tvar byl oválný a podlouhlý (Obr. 16 A). V přední a střední části těla byly stále (3.dpi) pozorovatelné miracidiální oční skvrny nebo jejich pozůstatky, u kterých docházelo postupně k dezintegraci na jednotlivá pigmentová granula (Obr. 17 A).

Povrch sporocysty byl pokryt tegumentem s velmi členitým povrchem, jenž tvořil četné výběžky (Obr. 16 B). V přední části těla byl patrný pozůstatek terebratoria miracidia (Obr. 16 A). Žádné další povrchové struktury pomocí SEM pozorovány nebyly. Senzorické struktury na povrchu těla se nepodařilo lokalizovat ani pomocí fluorescenčního značení alfa tubulinu.



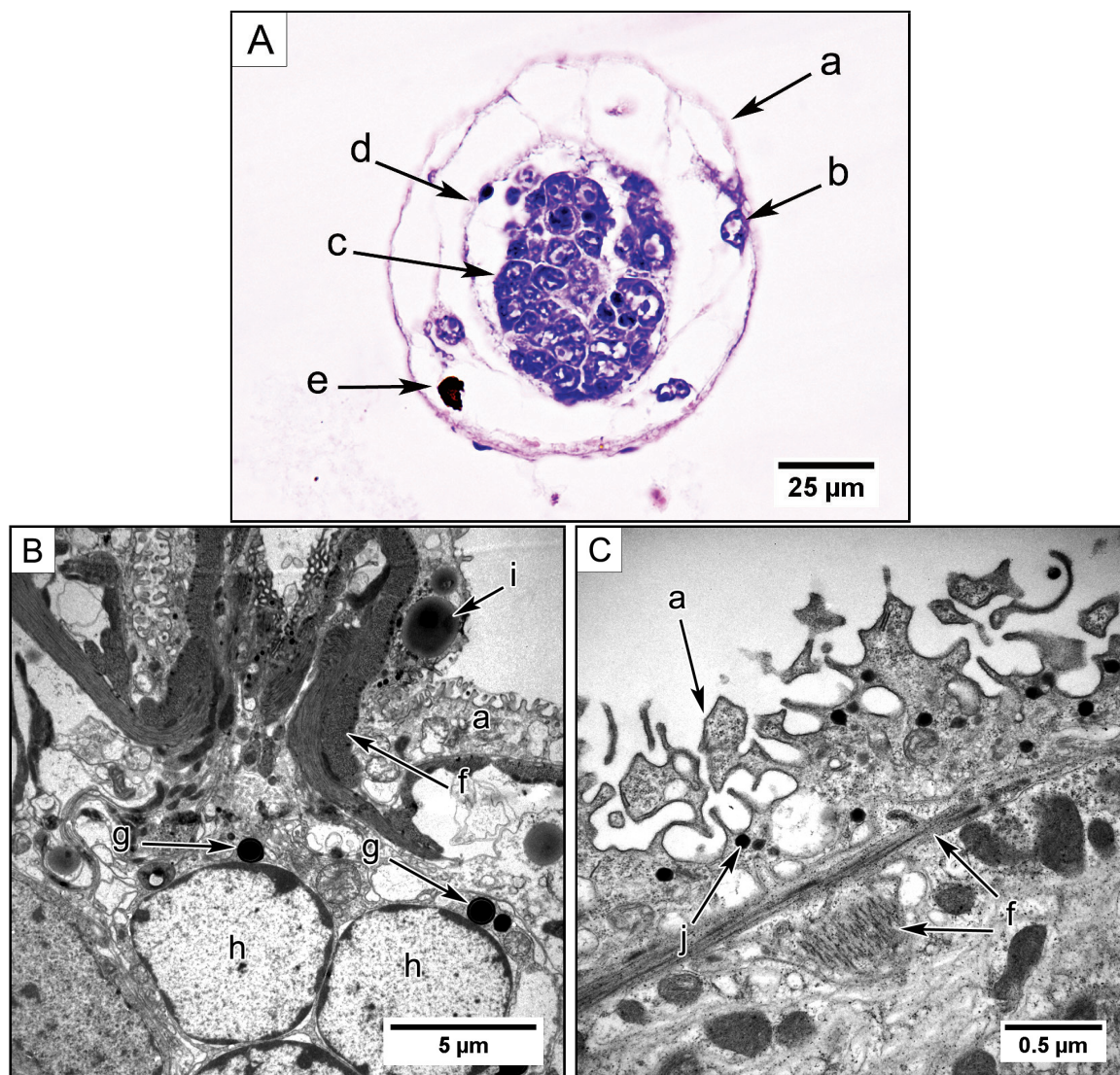
Obr. 16: Povrch sporocysty (SEM)

A: Celkový pohled, B: Detail členitého povrchu a – zbytek terebratoria, b - nečistoty

Na histologických řezech byla pozorována tenká tělní stěna, pod níž se nalézaly subtegumentální buňky (Obr. 17 A). Pomocí výběžků byly v kontaktu se zárodečnými buňkami obklopenými vrstvou embryonálního obalu. Zárodečné buňky měly velká jádra nacházející se v různém stádiu dělení a malé množství cytoplazmy.

Pozorování vnitřních struktur pomocí TEM bylo ztíženo křehkostí materiálu - při zpracování docházelo k vznikům artefaktů či k úplnému zničení materiálu. Povrch sporocysty byl oproti miracidii pokryt syncytiální vrstvou tegumentu s výrazně členitým povrchem (Obr. 17 C). V tegumentu se nacházely mitochondrie, lipidické kapénky a malé množství kulatých elektrondenzních granul (Obr. 17 C). Podlouhlá membranózní tělíska, která se hojně vyskytovala v mezibuněčných valech miracidii, nebyla v tegumentu sporocyst až na výjimečné případy pozorována. Pod tegumentem se nacházela bazální lamina a dvě vrstvy svaloviny. V přední části těla byly pomocí TEM pozorovány pozůstatky svaloviny apikální papily a apikální žlázy s několika sekrečními granuly a velkými kulatými jádry na její bázi (Obr. 17

B). Hlavové ganglium, které bylo u miracidia dominantní strukturou ležící za apikální žlázou, nebylo u sporocyst pozorováno. Senzorické struktury nebyly nalezeny ani pomocí TEM.



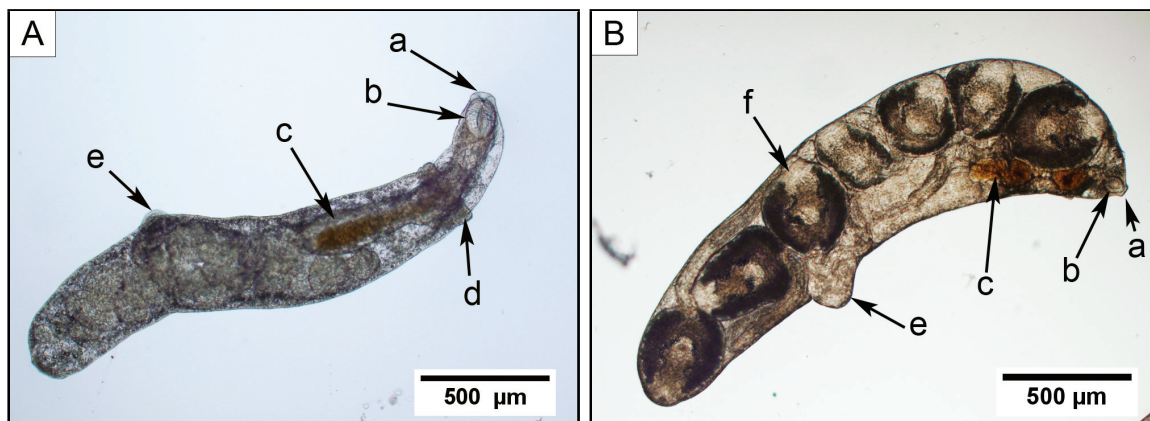
Obr. 17: Vnitřní struktury sporocysty

A: Příčný řez střední částí těla sporocysty (H&E). B: Pozůstatky apikální papily (TEM). C: Detail členitého povrchu (TEM). a – tegument, b – subtegumentální buňka, c – zárodečné buňky, d – embryonální membrána, e – oční skvrna, f – svalovina, g – granula apikální žlázy, h – jádra apikální žlázy, i – lipidová kapénka, j – sekreční granula

5.1.4 Redie

Redie byly získávány z hepatopankreatu plžů, vypitvané larvy se aktivně pohybovaly. V těle redí první generace (mateřské redie) se vyvíjela další generace redí, zatímco druhou generací

(dceřiné redie) byly produkovány cercárie (Obr. 18 A, B). Mateřské a dceřiné redie se mezi sebou lišily také v poměru velikosti trávicí soustavy k velikosti těla. Slepé vakovité střevo bylo zbarveno žluto-hnědě přítomností přijaté potravy a šlo tedy snadno rozpoznat pomocí světelného mikroskopu. U mateřských redií byl pharynx zpravidla mnohem výraznější a střevo dosahovalo i do poloviny těla (Obr. 18 A), zatímco u dceřiných střevo dosahovalo pouze zhruba do třetiny délky těla a pharynx byl nevýrazný (Obr. 18 B). Méně výrazná byla u dceřiných redií také límcovitá struktura, která se nacházela v přední části těla.



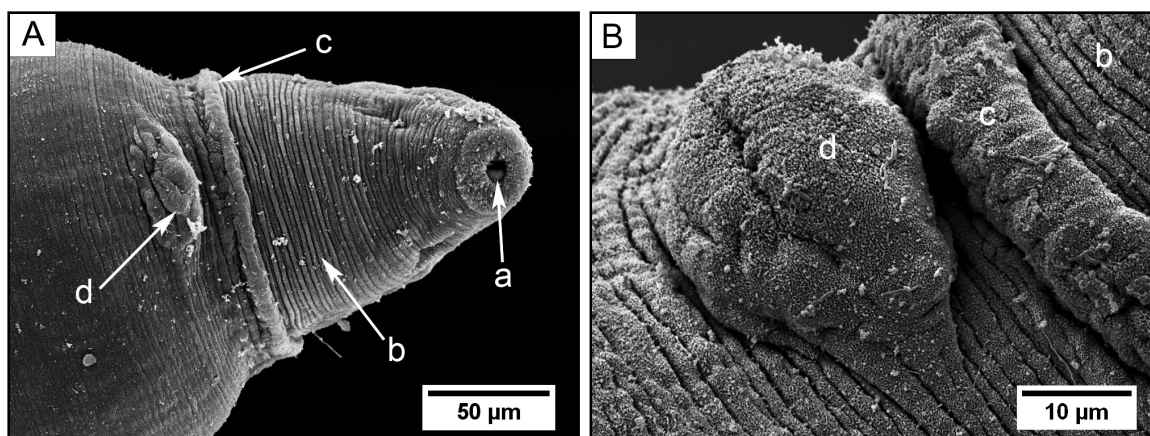
Obr. 18: Srovnání mateřské a dceřiné redie (SM)

A: Mateřská redie. B: Dceřiná redie. a - ústní otvor, b - pharynx, c - střevo, d - límec, e - procruscula, f - cercárie

Povrch redie

Povrch redie byl pokryt četnými nepravidelnými záhyby zejména v přední části těla, které byly uspořádány v závislosti na kontrakci těla larvy (Obr. 19 A). Při větším zvětšení pomocí SEM byly pozorovány výběžky zvětšující plochu vnějšího povrchu (Obr. 19 B).

V přední části těla redie se nacházel ústní otvor obklopený četnými papilami. V přední části těla byl dále pozorován výrazný záhyb tegumentu, tzv. límec, pod kterým se nalézala porodní papila (Obr. 19 A, B). V několika případech bylo pozorováno, že v místě límce dochází k vsunutí přední části těla do zadní. Porodní papila měla kónický tvar a vystupovala nad povrch těla. V zadní části těla se nacházely párové výběžky (procruscula) kulovitěho tvaru, které slouží redii k pohybu (Obr. 18 B). Tělo bylo zakončeno okrouhlým kaudálním výběžkem. Tyto útvary byly pozorovány v různých fázích kontrakce a odrážely tak zřejmě stav, ve kterém se daní jedinci nacházeli v okamžiku fixace.

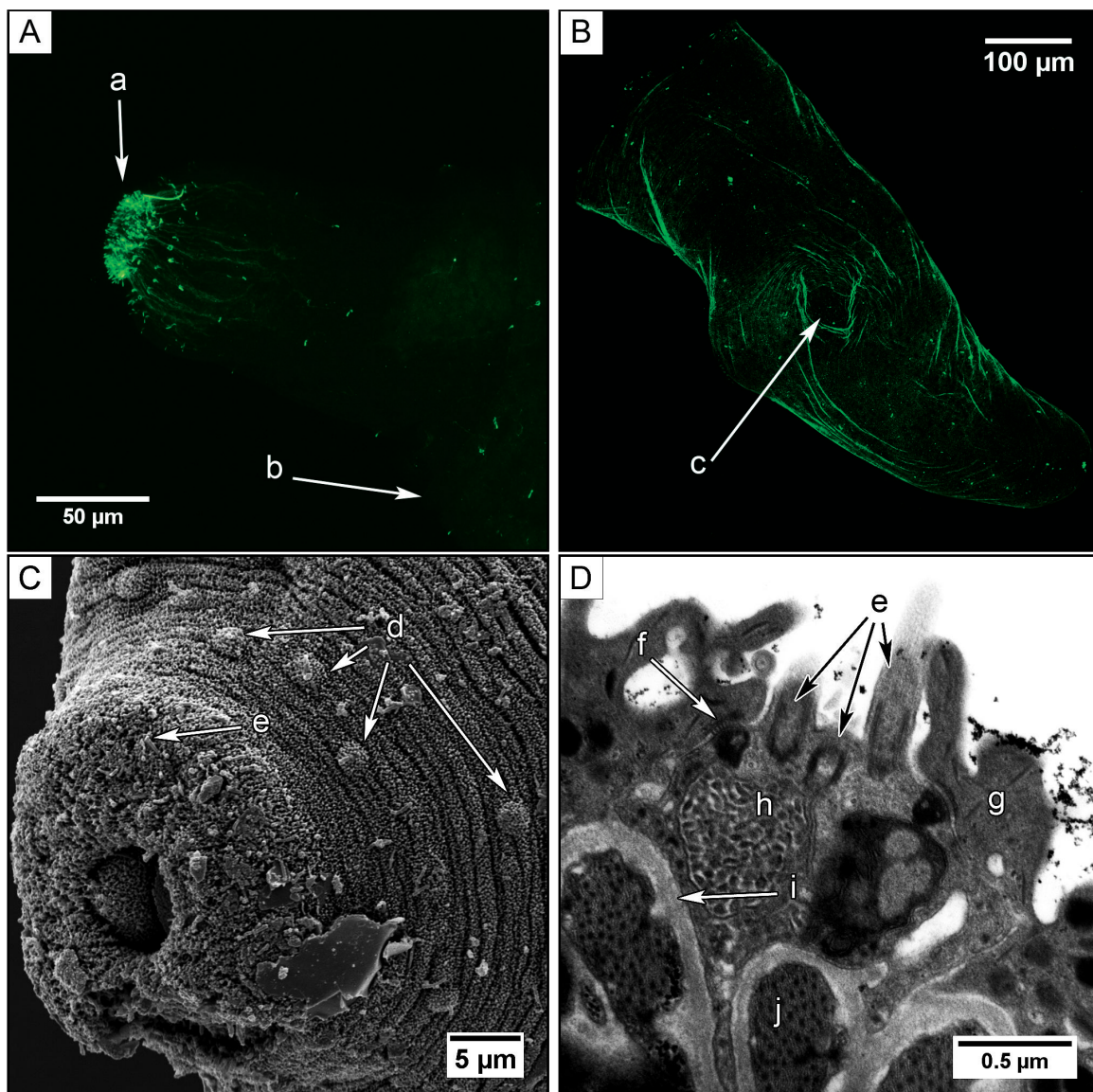


Obr. 19: Povrchové struktury redie (SEM)

A: Přední část těla redie. B: Detail porodní papily a límce. a – ústní otvor, b - záhyby tegumentu , c – límec, d – porodní papila

Senzorické struktury redií

Ciliární senzorické struktury byly pozorovány pomocí fluorescenčního značení alfa tubulinu po celém povrchu těla redie, nejvíce se jich nacházelo v přední části těla, zejména kolem ústního otvoru redie (Obr. 20 A, C), směrem k zadní části těla se jejich počet snižoval (Obr. 20 B). Při pozorování pomocí elektronové mikroskopie se podařilo odlišit 4 typy receptorů. Okolo ústního otvoru a po těle redie se nacházely unicilární senzorické papily ohraničené nízkým tegumentálním límcem (Obr. 20 C). Na okraji ústního otvoru byly pozorovány kopecovitě aciliární papily, nicméně není jisté, zda se nejednalo o unicilární papily poškozené během zpracování objektu. Kolem přední části těla byly kruhovitě uspořádány unicilární papily s vysokou hemisférickou bází (Obr. 20 C). V bazální části této papily, která vystupovala nad tělní povrch, byly TEM pozorovány drobné vezikuly a mitochondrie. Papila byla v tegumentu uchycena pomocí žíhaného desmozomu. V těsné blízkosti byl na ultratenkém řezu zachycen i multicilární typ papily (Obr. 20 D). Na řezu byly pozorovány až tři cilie ohraničené límcem tegumentu, se kterým byla papila spojena pomocí silného prstence žíhaného desmozomu.



Obr. 20: Senzorické struktury redie

A, B: Lokalizace ciliárních papil na těle redie, značení α tubulinu (Konfokální mikroskop). A: Přední část těla. B: Zadní část těla. C: Hemisférické ciliární papily v přední části těla (SEM). D: Řez multicilární papilou v přední části těla (TEM). a – ústní otvor, b – límec, c – procruscula, d – hemisférické papily, e – cilie, f - desmozom, g – tegument, h – nervový výběžek, i – bazální lamina, j - svalovina

Stavba těla

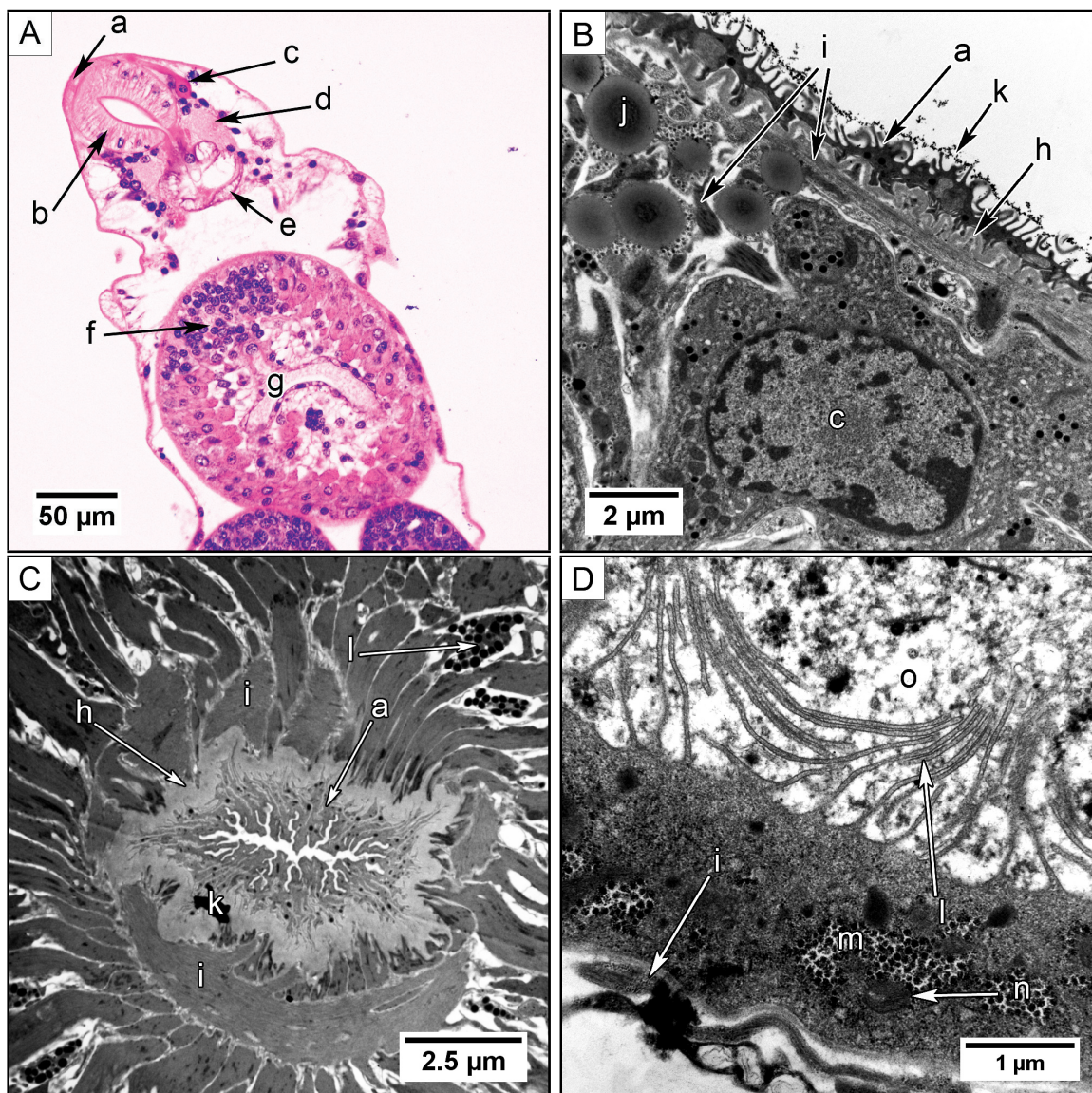
Povrch redie byl pokryt četnými zřaseními, při detailním zkoumání TEM byly znatelné četné mikrovily (Obr. 21 B). Tvar povrchových výběžků se lišil v různých částech těla. V přední části těla redie byly výběžky tegumentu kratší a širší, zatímco v zadní části těla byly dlouhé a tenké. Povrch redie se barvil eosinofilně, a to zejména v přední části těla (Obr. 21 A). Cytoplazma tegumentu byla granulární, vyskytovaly se v ní mitochondrie a kulatá elektrodenzní granula o průměru zhruba $0,16\ \mu\text{m}$ (Obr. 21 B). Množství těchto granul bylo větší v přední části těla redie.

Pod tegumentem se nacházela výrazná bazální lamina a dvě vrstvy svaloviny (Obr. 21 B). V několika případech bylo pozorováno napojení tegumentu na těla subtegumentálních buněk, která obsahovala značné množství kulatých elektrodenzních granul. Mezi subtegumentálními buňkami se vyskytovaly výběžky buněk, které ve své cytoplazmě obsahovaly velké množství lipidů, glykogenu a oválných elektrodenzních granul.

Redie měly dobře vyvinutou trávicí soustavu, na jejímž začátku se za ústním otvorem nacházel mohutně osvalený pharynx vypodložený silnou bazální laminou (Obr. 21 A, C). Mezi jednotlivými svalovými vlákny byly pozorovány výběžky buněk s oválnými elektrodenzními granuly (Obr. 21 C). Vnitřní povrch pharyngu vybíhal do lumen ve formě mírných záhybů a byl kryt vrstvou tegumentu. V tegumentu pharyngu byla pozorována malá kulatá elektrodenzní granula stejně velká jako ta v povrchovém tegumentu. Na pharynx navazoval krátký oesophagus, v jehož úrovni se nacházelo nervové ganglion a velký počet jader subtegumentálních i dalších typů buněk (Obr. 21 A). Výrazně eosinofilně se barvilo několik velkých buněk, jejichž těla směřovala laterálně podél pharyngu dopředu k ústnímu otvoru, kde se zužovala (Obr. 21 A). Pomocí TEM bylo pozorováno, že v cytoplazmě těchto buněk se nacházelo velké množství elektrodenzních granul shodných s granuly subtegumentálních buněk.

Oesophagus ústil do střeva, jehož povrch byl tvořen plochými epitelovými buňkami s jádrem. Apikální část střevního epitelu byla zvětšená formou dlouhých, tenkých mikrokľů, které vybíhaly do lumen střeva (Obr. 21 D). V cytoplazmě epitelových buněk se nacházely četné mitochondrie a granula glykogenu. V některých buňkách střevního epitelu byla pozorována i velká ($0,4 - 0,8\ \mu\text{m}$) kulatá elektrodenzní granula. Epitel střeva byl vypodložen bazální laminou, pod kterou se nacházela svalová vlákna. V tělní dutině se kromě střeva nacházely zárodečné buňky a zárodky cercarií v různých stádiích vývoje (Obr. 21 A). Časnější stádia byla obklopena tenkou vrstvou primitivního epitelu.

Exkreční soustava redie obsahovala velké množství plaménkových buněk, které byly nahloučeny zejména ve střední části těla. Vyústění exkrečních duktů na povrch těla se však lokalizovat nepodařilo.



Obr. 21: Vnitřní struktury redie

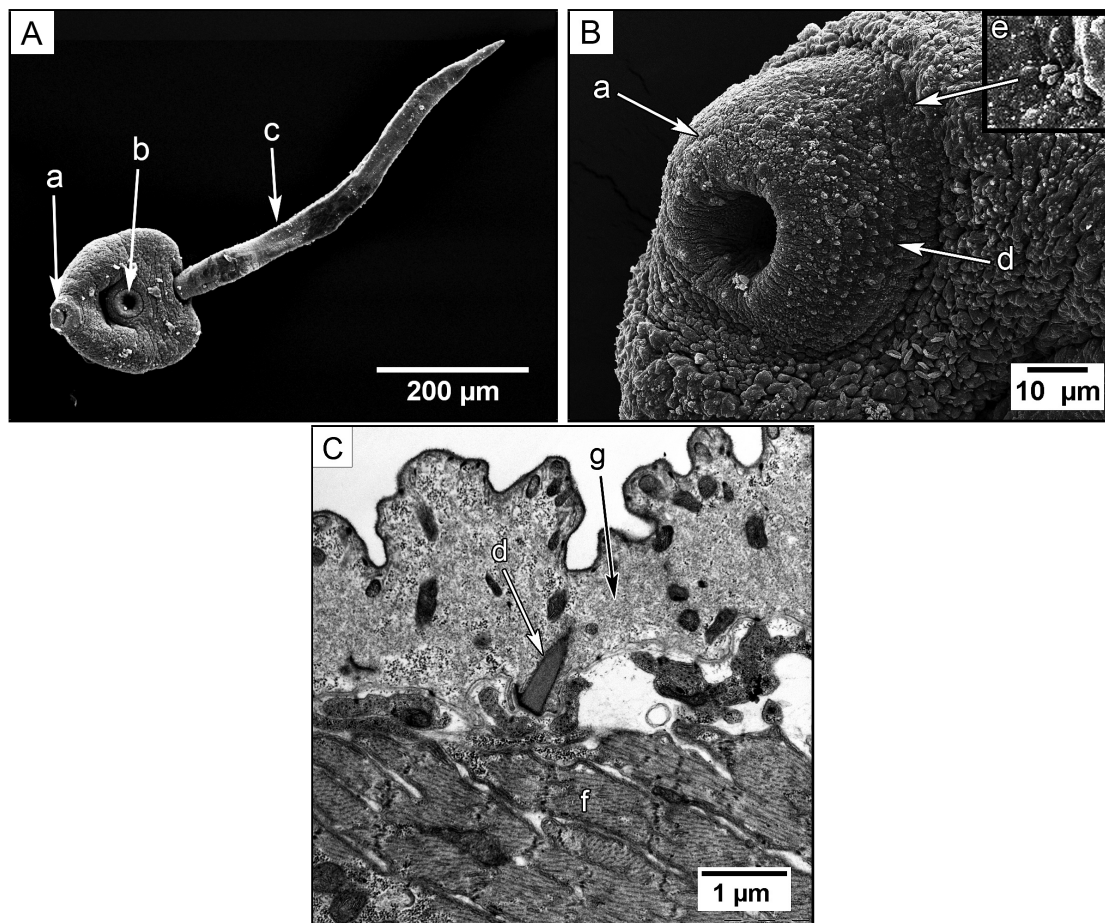
A: Podélný řez přední částí těla redie (H&E). B: Řez tělní stěnou s mikrovily na povrchu (TEM). C: Příčný řez pharyngem (TEM). D: Detail střevního epitelu (TEM). a – tegument, b – pharynx, c – subtegumentální buňka, d – nervové ganglium, e – střevo redie, f – cercárie, g – střevo cercárie, h – bazální lamina, i – svalovina, j – lipidová kapénka, k – nečistoty, l – výběžky epitelu, m – glykogen, n – mitochondrie, o – střevní obsah.

5.1.5 Cerkárie

Za účelem mikroskopického zkoumání, byly použity cercárie uvolněné v průběhu pitev plžů a dále z celých fixovaných hepatopankreatů, kde se nacházely cercárie v různých stádiích vývoje. Nezralé cercárie se od zralých lišily zejména v délce ocásku, zabarvení těla a schopností encystovat se na podkladu.

Povrchové struktury cercarie

Cercárie měly gymnocephalní tvar těla s jednoduchým nevětveným ocáskem (Obr. 22 A). Tělo cercárie bylo otrněné. Pomocí SEM byly trny na povrchu pozorovány pouze v oblasti ústní přísavky (Obr. 22 B).



Obr. 22: Povrchové struktury cercarie

A: Tělo cercárie, ventrální strana (SEM). B: Přední část těla cercárie s otrněním a multiciliární papilou na bázi ústní přísavky (detail) (SEM). C: Řez tegumentem ocásku s trnem (TEM). a – ústní přísavka, b – břišní přísavka, c – ocásek, d – otrnění, e – multiciliární papila, f – svalovina, g – tegument.

Zbylý povrch těla cercárie byl pokryt pravidelně rozmístěnými prohlubněmi. S využitím světelného mikroskopu byly trny pozorovány až po úroveň břišní přísavky, pomocí TEM byly trny nalezeny i dále za břišní přísavkou, ale jejich množství bylo menší než v přední části těla.

Na těle i ocásku se nacházely četné sensorické papily. Ocásek byl jednoduchý, hladký, kulatého průřezu s pravidelným příčným segmentováním a se spirálním zakončením (Obr. 22 A; 23 B). V několika případech byly pomocí SEM pozorovány po stranách ocásku lemy, kdy se jednalo zřejmě o artefakt způsobený zpracováním vzorku. Trny na povrchu ocásku pomocí SEM pozorovány nebyly, ale pomocí TEM jich bylo několik pozorováno v tegumentu v bazální části ocásku (Obr. 22 C).

Rozmístění a formy sensorických struktur

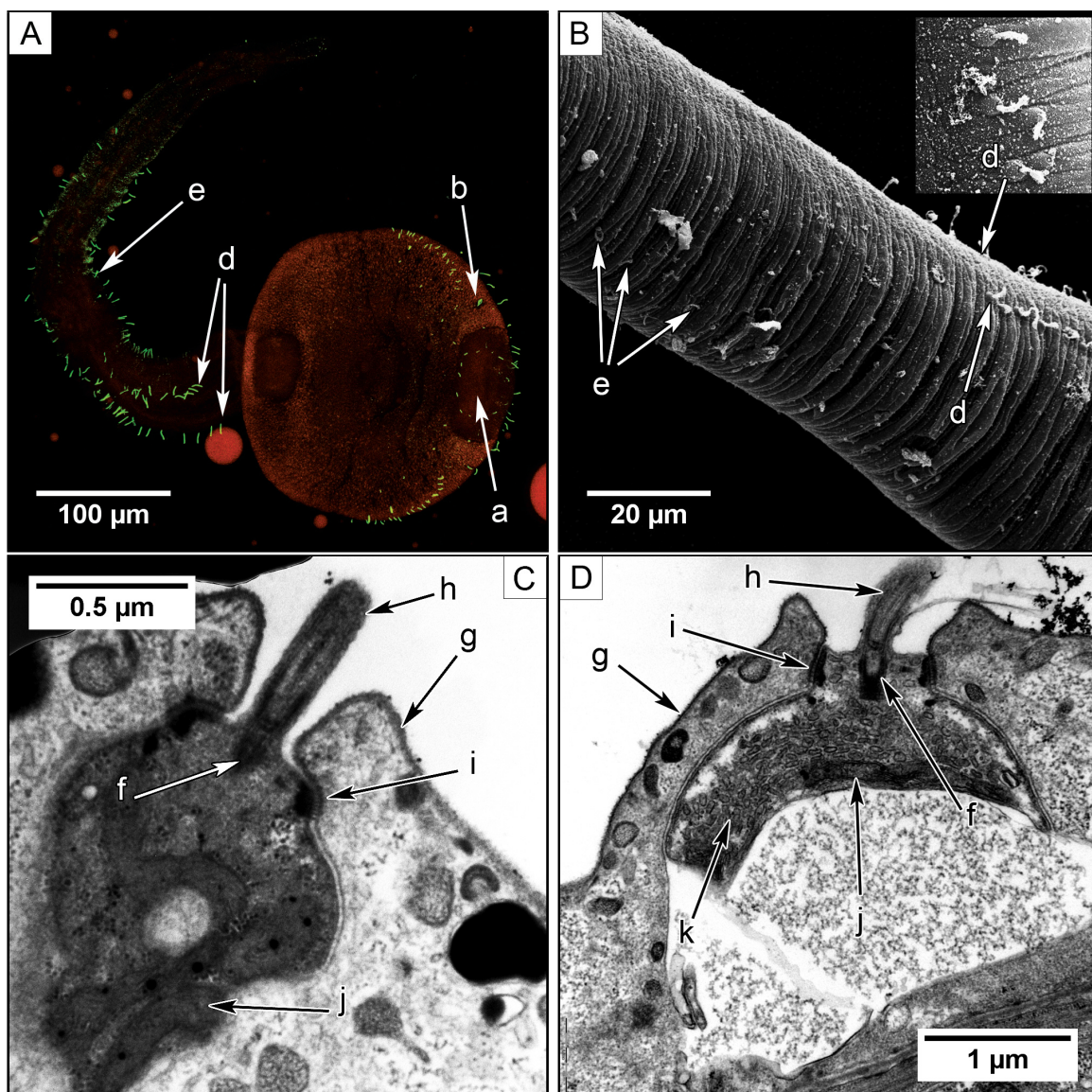
Pomocí SEM a fluorescenčního značení α - tubulinu bylo pozorováno rozmístění sensorických papil na těle i ocásku cercárie (Obr. 23 A, B). Zvýšený výskyt papil byl zaznamenán v přední části těla zejména kolem ústní přísavky (Obr. 23 A). Tyto papily byly dlouhé, uniciliární s tegumentálním límečkem. Ciliární část papily měla klasické uspořádání mikrotubul 9+2 a byla ukotvena pomocí bazálního tělíska (Obr. 23 C). Nervové zakončení bylo tvořeno měchýřkem, který obsahoval elektronlucentní vezikuly a mitochondrie. Papila byla v tegumentu ukotvena pomocí prstencových žíhaných desmozomů. Na vnitřním obvodu ústí obou přísavek se nacházely i aciliární kopečkovité struktury. Na bázi ústní přísavky byla pomocí SEM zaznamenána i multiciliární papila se třemi krátkými ciliemi (Obr. 22 B; 23 A).

Na ventrální straně ocásku bylo v části přilehlé k tělu pozorováno 17 párů ve dvou řadách uspořádaných ciliárních papil s kopečkovitou bází (Obr. 23 A, B, D). Tyto papily byly také v tegumentu ukotveny pomocí žíhaných desmozomů. (Obr. 23 D). V midlaterální části ocásku se nacházely dvě dlouhé řady (cca 25) ciliárních papil s nízkou bází (Obr. 23 A, B). Jejich počet se nepodařilo přesně determinovat.

Stavba těla

Cercárie byly studovány na řezech hepatopankreatu v různých stádiích vývoje. V redii docházelo k jejich diferenciaci ze zárodečných buněk až po téměř plně formované cercárie. Ve tkáni plže se nacházely i jednotlivé cercárie, které se uvolnily z redií.

Cercárie měly v přední části těla osvalenou ústní přísavku, na kterou navazoval malý pharynx (Obr. 25 A), jejich povrchy byly pokryté tegumentem. Následovalo střevo, které se před břišní přísavkou rozdělovalo do dvou větví. Stěna střeva byla tvořena velkými epitelálními buňkami, spojenými desmozomy (Obr. 24 A). Apikální povrch epitelu byl rovný a nevytvářel záhyby, bazální část epitelu byla vypodložena bazální laminou, pod kterou se



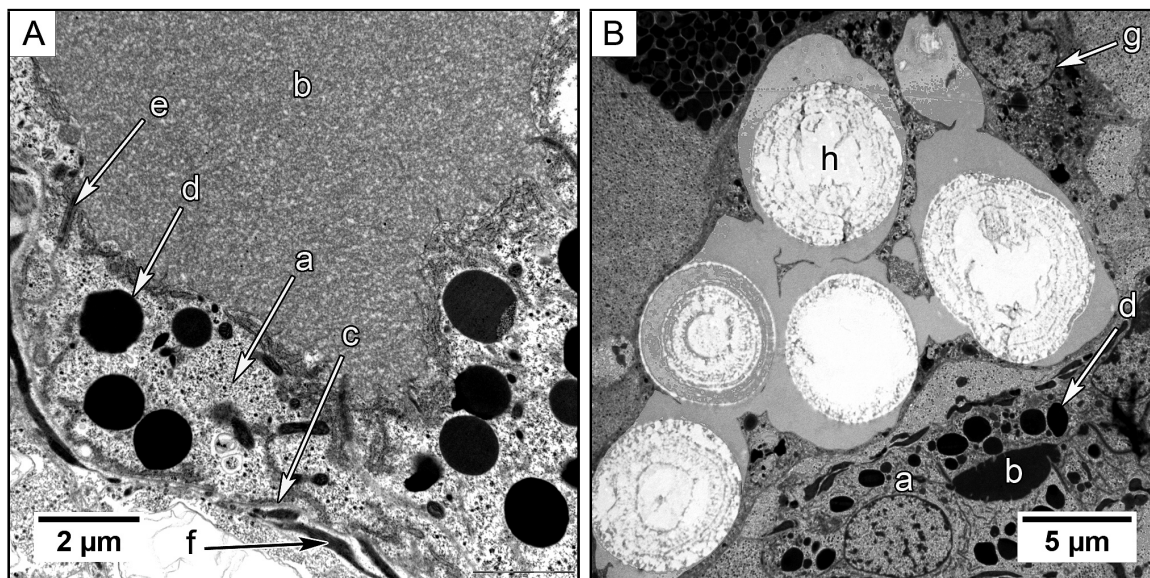
Obr. 23: Senzorické struktury cercárií

A: Lokalizace ciliárních papil na těle cercárie, značení α tubulinu (Konfokální mikroskop). B: Ciliární papily na ocásku. Detail: papily na ventrální straně ocásku (SEM). C: Řez papilou v oblasti ústní přísavky (TEM). D: Řez papilou na ventrální části ocásku (TEM). a – ústní přísavka, b – (multi)ciliární papila, c – ocásek, d – ciliární papily na ventrální straně ocásku, e – ciliární papily po stranách ocásku, f – bazální tělísko, g – tegument, h – cilie, i – desmozom, j – mitochondrie, k – vezikula nervového zakončení.

nacházela svalová vlákna. V cytoplasmě buněk střevního epitelu se nacházelo velké množství hrubého endoplazmatického retikula a elektrondenzních granul kulatého tvaru, která měřila průměrně $1,2\ \mu\text{m}$. Nebylo pozorováno, že by se cercárie během vývoje v hepatopankreatu aktivně živily tkáněmi plže, nicméně lumen jejich střeva byl vyplněn homogenním materiálem, který se barvil světle růžově a světle modře pomocí H&E a toluidinové modři (Obr. 25 A, B).

Břišní přísavka byla výrazně osvalená (Obr. 25 A, B), mezi jejími svalovými buňkami se nacházely cytony subtegumentálních buněk vyživující tegument na povrchu přísavky, který se od tělního lišil absencí cystogenních granul. V blízkosti břišní přísavky se nacházely zárodečné buňky, které se H&E barvily tmavě modře (Obr. 25 A).

Exkreční soustava byla tvořena velkým počtem plaménkových buněk rozmístěných párově po celém těle, v ocásku plaménkové buňky pozorovány nebyly. V exkrečních duktách byla pozorována velká ($7\text{--}8\ \mu\text{m}$), kulatá světlolomná granula (Obr. 24 B; 26 A). Dukty ústily do exkrečního měchýře v zadní části těla. Z exkrečního měchýře pokračovaly dva další dukty do ocásku, kde zhruba v jedné pětině jeho délky ústily vývody kryté blankou s otvory. Svalovina ocásku byla uspořádaná ve 2 vrstvách (Obr. 22 C). Vnější okružní byla méně vyvinutá, oproti tomu podélná svalovina byla mohutně vyvinutá a tvořila pravidelné bloky s žíhanou strukturou. Sarkoplasmatická část myocytů obsahovala jádra, velké tubulární mitochondrie a glykogen.



Obr. 24: Trávicí a vylučovací soustava cercárie (TEM)

A: Střevní epitel. B: Exkreční granula detail. a – střevní epitel, b – homogenní obsah střeva, c – bazální lamina, d – sekreční granula, e – desmozom, f – svalovina, g – epitel exkrečních cest, g – exkreční granula.

Cystogenní žlázy cercárie

V těle cercárie byl již od jejich zárodečných forem přítomných v redii pozorován pomocí použitého histologického barvení vývoj 4 typů cystogenních žlázových buněk. Množství obsahu těchto žláz se postupně zvyšovalo s vývojem a růstem cercárie. Stěny buněk byly vyztuženy pomocí mikrotubulů a pomocí TEM bylo v některých případech pozorováno jejich napojení na tegument (Obr. 27 C). Mezi cystogenními buňkami se nacházela i těla subtegumentální buněk, na základě charakteru jejich obsahu (malé sekretorické vezikuly) bylo možné rozeznat více typů. Vývoj jednotlivých typů žláz a jejich účast při formování tegumentu byla studována na řezech hepatopankreatu nakažených plžů. Jednotlivé typy cystogenních žlázových buněk nacházející se u nezralých cercárií v těle redií byly označeny jako cystogenní žlázy I, II, III, IV.

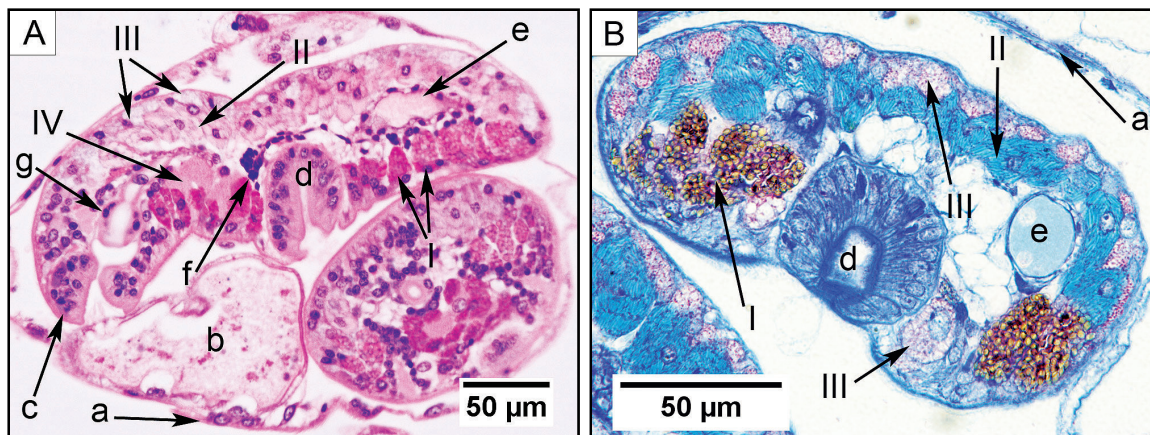
I - Tento typ buněk se nacházel po téměř celé ventrální straně těla cercárie (Obr. 25 A, B), podlouhlé buňky se zužovaly směrem k ventrálnímu okraji těla. Buňky obsahovaly opalescentní granula, která se barvila růžovo-červeně za použití H&E (Obr. 25 A). V případě fixace Bouinovým roztokem tato granula zůstávala žlutě zabarvena, což komplikovalo interpretaci výsledků barvení. Granula měla protáhlý tvar se zašpičatělými konci a velikost cca 4 μm (Obr. 28 A, B). Na řezech vnitřní struktura granul vykazovala žíhání a byly patrné rovnoměrně uspořádané svazky materiálu obaleného membránou (Obr. 27 A).

II – Tyto buňky zaplňovaly dorzální část těla cercárie (Obr. 25 A, B; 26 A). V buňkách tohoto typu se nacházely paralelně uspořádané tyčinkovité útvary s dutinou v uprostřed (Obr. 27 B), dlouhé až 6 μm . Obsah těchto buněk se barvil světle pomocí H&E a tmavě modře toluidinovou modří (Obr. 25 A, B; 26 A). Tyčinkovité produkty byly tvořeny koncentricky svinutými lamelárními strukturami (Obr. 27 B). U cercárií v časnější fázi vývoje měly tyto produkty jen málo volně uspořádaných lamel (Obr. 27 B - detail), počet jejich otáček se postupně v průběhu vývoje zvyšoval. Mezi těmito lamelárními produkty se v malém množství vyskytovala i malá oválná granula nelamelárního charakteru.

III – Tento typ cystogenních žlázových buněk se vyskytoval dorzálně a dorzolaterálně v řadách těsně pod povrchem těla mezi buňkami typu II. Několik těchto buněk bylo pozorováno i v okolí břišní přísavky. PAS barvením se buňky zabarvovaly do tmavě fialova, s toluidinovou modří docházelo k metachromatické reakci a vzniku růžového zabarvení (Obr. 25 B), což prokazovalo přítomnost kyselých mukopolysacharidů. O mukoidního charakteru těchto buněk svědčilo i jejich slabé zabarvení do modra pomocí H&E (Obr. 21 A). Obsah těchto buněk byl tvořen membránou obalenými granuly nepravidelného tvaru o velikosti zhruba 0,5 μm , mezi nimiž se nacházela menší (0,2 μm) kulovitá granula také obalená membránou (Obr. 27 C).

IV - Tyto buňky tvořily skupinku na ventrální straně těla mezi ústní a břišní přísavkou (Obr. 25 A). Pomocí H&E se barvily slabě růžově a toluidinové modří světle modře. Nejsnáze

byly lokalizovatelné pomocí PAS barvení, kterým se barvily sytě růžovou barvou (Obr. 26 B). Pomocí TEM bylo v těchto buňkách pozorováno velké množství těsně nahloučených drobných kulovitých granul o různé elektronové denzitě i velikosti ($0,5 - 0,8 \mu\text{m}$) (Obr. 27 D).



Obr. 25: Cercárie během vývoje v redii

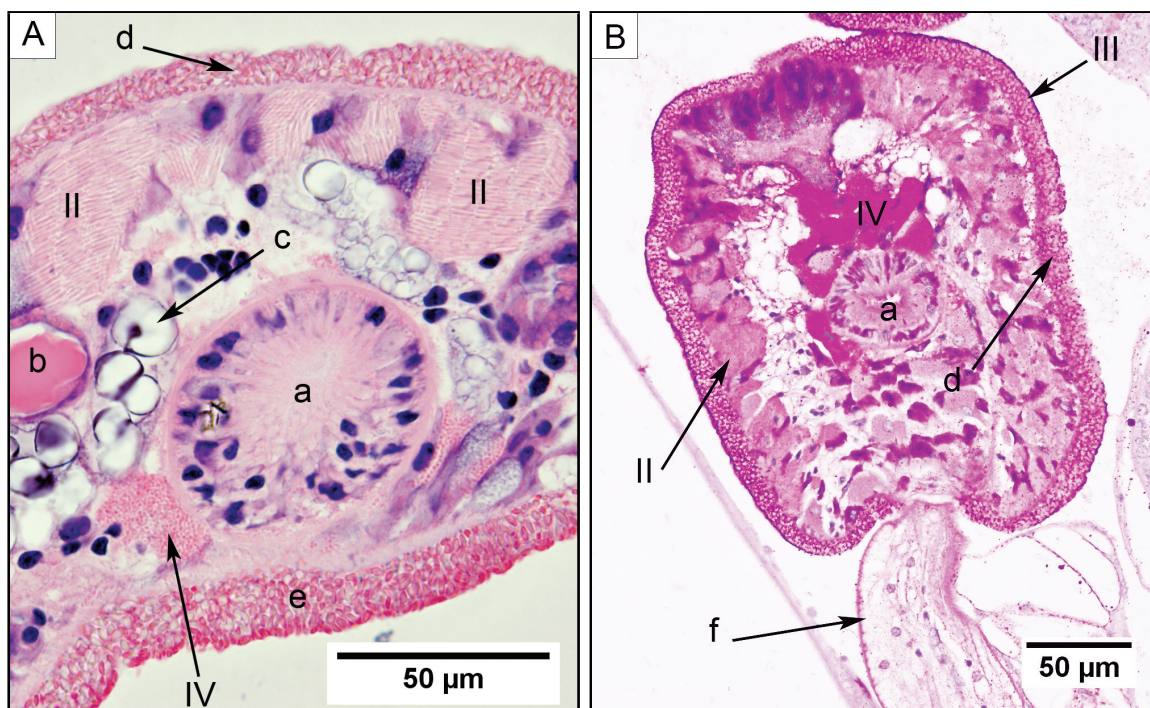
A: Podélný řez cercárií (H&E). B: Příčný řez cercárií v oblasti acetabula (toluidinivá modř). a - stěna redie, b - střevo redie, c - ústní přísavka, d - břišní přísavka, e - střevo cercárie, f - zárodečné buňky, g - pharynx, žlázy typu I, II, III, IV.

Formování tegumentu cercárie

V nejčasnějších fázích vývoje v redii byl povrch cercárie tvořen tzv. embryonálním epitelem (Obr. 27 C), který v pozdějších fázích degeneroval a byl nahrazen definitivním tegumentem. Do tegumentu byly uvolňovány produkty subtegumentálních buněk a v dalších fázích vývoje i cystogenních žláz. Jako první z cystogenních produktů byly v tegumentu pozorovány granulární produkty žláz typu III, které zde vytvořily tenkou vrstvu. K vyloučení těchto produktů do tegumentu docházelo v době, kdy se cercárie nacházela stále v těle redie. Nejvýraznější změny byly pozorovány po opuštění redie, kdy došlo k vylučování granulárního obsahu ventrálních žláz typu I do tegumentu a jeho následnému rozprostření v téměř celém prostoru tegumentu. Produkty žlázových buněk byly deponovány v celém tegumentálním povrchu kryjícím vlastní tělo cercárie, s výjimkou přísavek a místa napojení ocásku (Obr. 26 A, B).

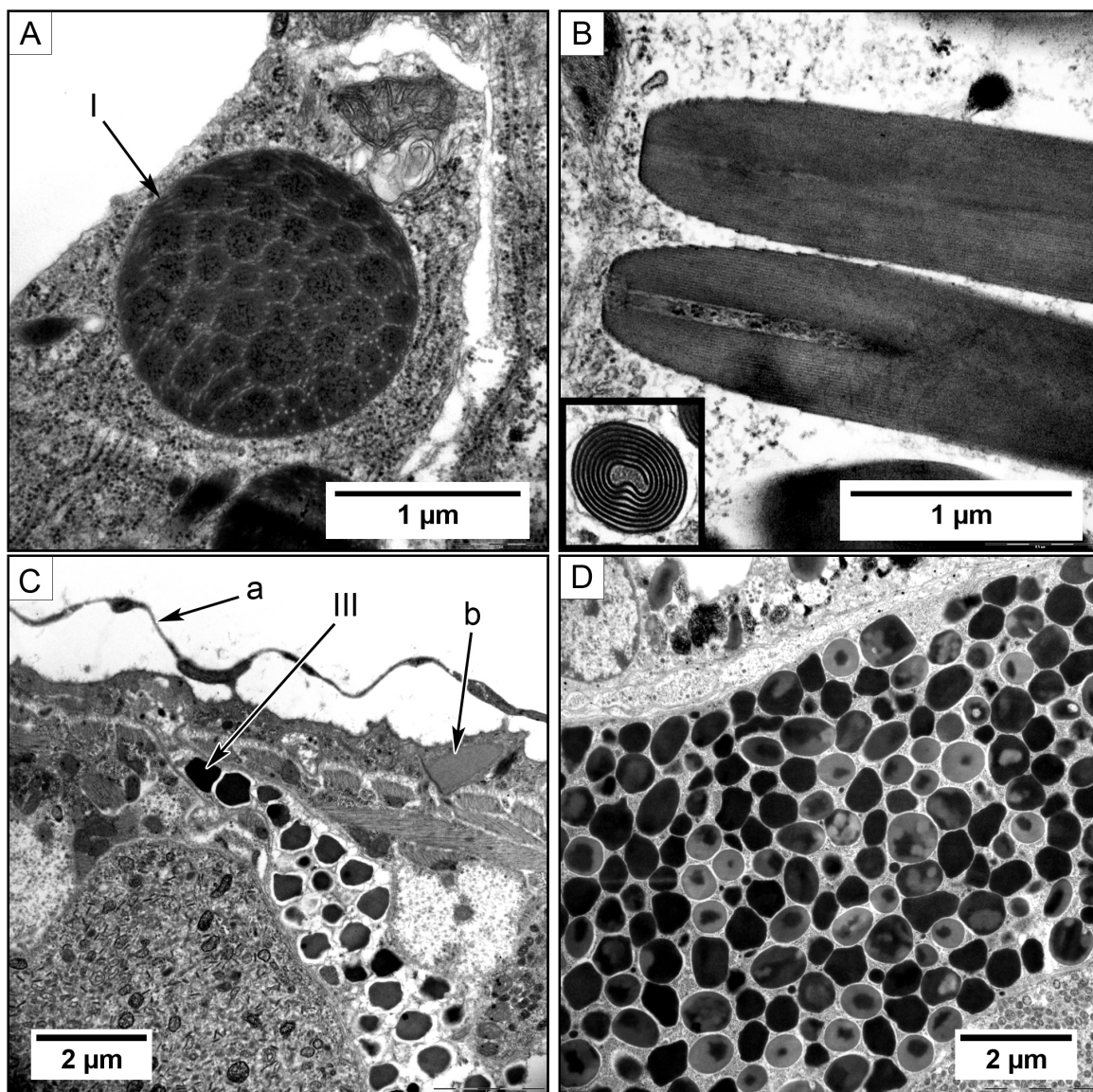
Distribuce jednotlivých typů granul se lišila v různých částech tegumentu. Na dorzální straně cercárie byla těsně pod membránou uspořádána jedna řada tvořená granulami III. typu, pod kterými ležela silná vrstva z granul ventrálních žláz typu I, mezi kterými se nacházela neuspořádaně granula ze žláz typu III (Obr. 28 A; 26 B). Na ventrální straně cercárie tato vnější vrstva nebyla patrná a jednotlivá granula se zde nacházela neuspořádaně (Obr. 28 B). Produkty II. a IV. typu cystogenních buněk byly pozorovány pouze ve žlázových buňkách cercárie (Obr. 26 A, B) nebo v kanálcích vyztužených mikrotubuly, nikdy ale nebyly nalezeny

v povrchovém tegumentu cercárií .



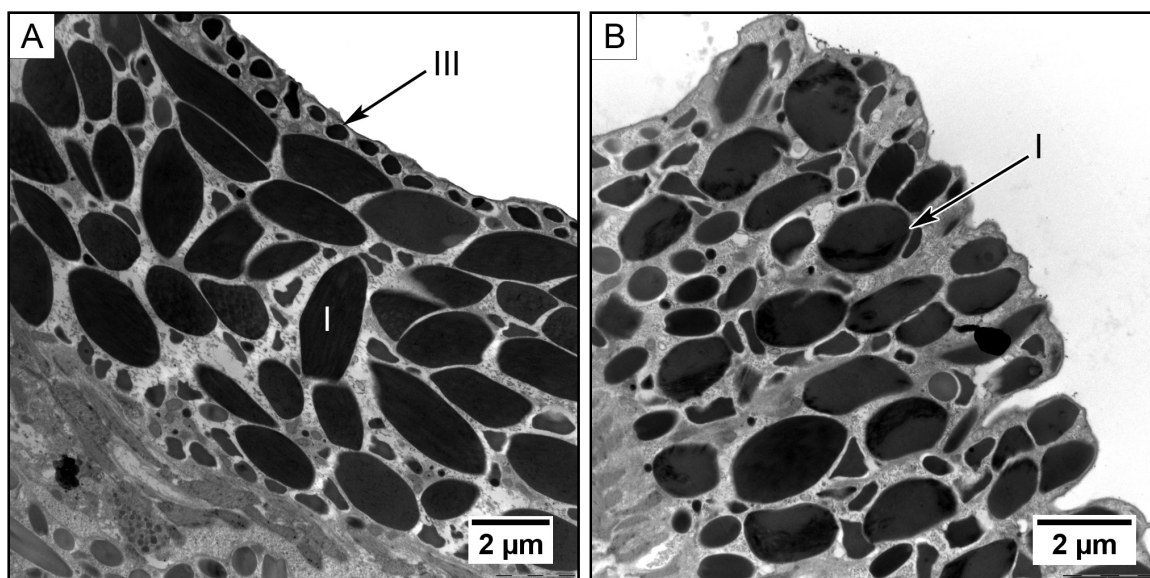
Obr. 26: Cercárie vyskytující se volně ve tkáni plže

A: Příčný řez cercárií v oblasti acetabula (H&E). B: Podélný řez cercárií (PAS). a – břišní přísavka, b – střevo, c – exkreční soustava, d – tegument na dorzální části těla, e – tegument ventrální části těla, f – ocásek; cystogenní žlázy II, III, IV.



Obr. 27: Ultrastruktura produktů jednotlivých typů cystogenních žláz (TEM)

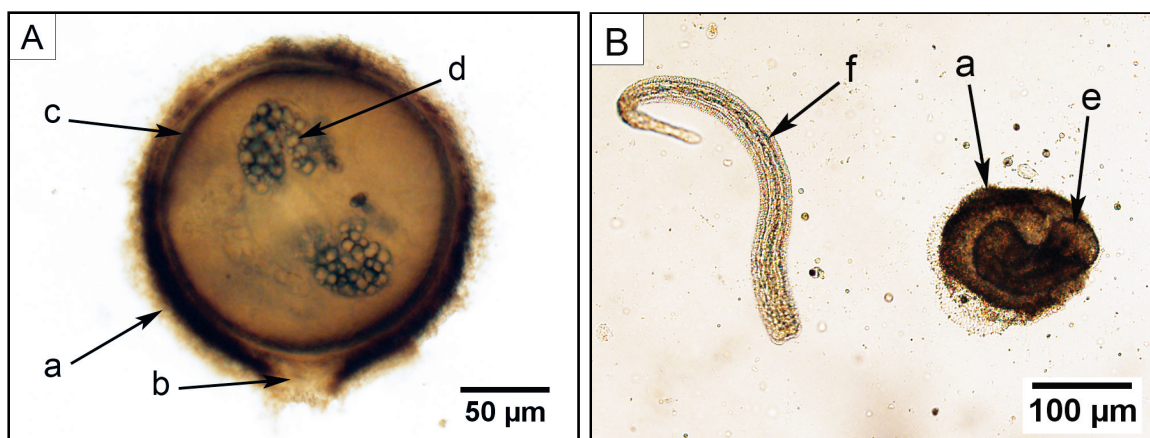
A: Typ I – příčný řez. B: Typ II – Příčné i podélné řezy svinutými lamelami. C: Typ III – vyústění cystogenní žlázy do tegumentu. D: Typ IV – velké množství kulovitých granul. a - degenerující primitivní epitelium, b – trn.



Obr. 28: Distribuce jednotlivých typů cystogenních granul v tegumentu cercárie (TEM)
A: Tegument na dorzální straně s vnější uspořádanou vrstvou granul III. typu. B: Tegument na ventrální straně.

5.1.6 Průběh encystace

Cerkárie se po opuštění hostitelského plže aktivně pohybovaly ve vodním prostředí a po přichycení na pevném podkladu tvořily dlouhodobě přežívající stádia – metacerkárie (Obr. 29 A). Proces tvorby metacerkárie byl pozorován pod binolupou na cercáriích získaných během pitev přirozeně i experimentálně infikovaných plžů. Cerkárie se velmi rychle po kontaktu s pevným podkladem přichytily pomocí přísavky. Bezprostředně poté byly pozorovány kontrakce těla cercárie doprovázené sekrecí granul deponovaných v tegumentu. Okolo cercárie se vytvořil vnější obal světlé barvy s nepravidelnými obrysy. Po několika minutách začala cercárie v obalech rotovat po i v protisměru hodinových ručiček a dotvářet vnitřní vrstvy metacerkariálních obalů. Během těchto procesů se ocásek cercárie stále pohyboval, až došlo k jeho úplnému odvržení, po kterém byly ještě nějakou dobu pozorovány trhavé pohyby. Pohyb novotvořené metacerkárie uvnitř obalů byl pozorován i po více jak jedné hodině od počátku encystačního procesu. Bylo zaznamenáno také několik případů, kdy cercárie nedokázala vytvořit plně formované obaly a nedošlo tak k encystaci (Obr. 29 B).



Obr. 29: Proces encystace (Světelná mikroskopie)

A: Encystující se cercárie. B: Nedokončená encystace. a - vnější obal, b – místo napojení ocásku, c - vnitřní obal, d - granula v exkrečních dukttech, e – metacerkárie, f – odvržený ocásek.

5.1.7 Metacerkárie

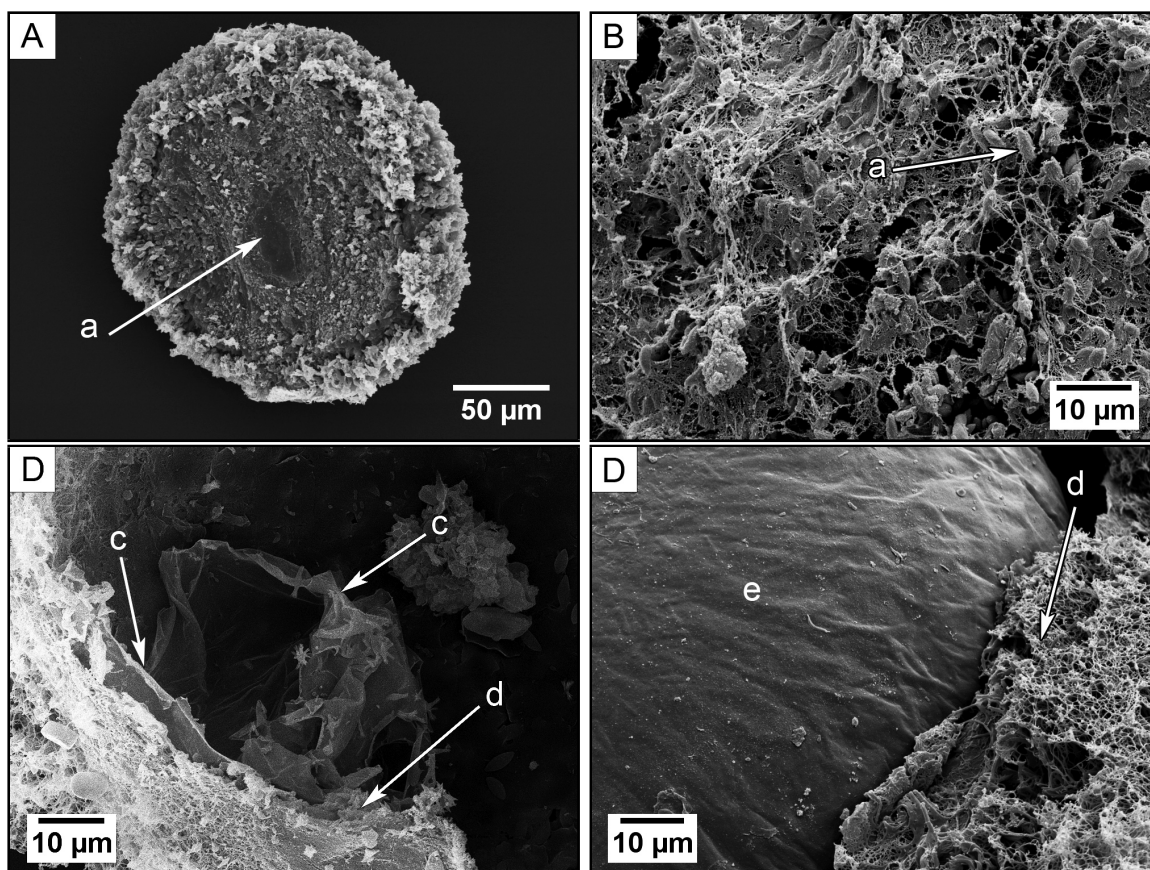
U encystovaných metacerkárií byl na povrchu zřetelný obal hnědavé barvy (Obr. 29 B), který tvořil hemisférický útvar po stranách přichycený k podkladu (Obr. 30 A; 31 A). Tento obal bylo možné snadno mechanicky odstranit, díky čemuž mohl být pozorován vnitřní obal, který byl hladký a bezbarvý. Vrstva tvořená tímto světlým materiálem byla nepropustná pro fixativa, přičemž pozorování jedinci vykazovali známky života i po více jak jedné hodině ve fixativu.

Vnitřní struktury

Ochranné obaly metacerkárie zabraňovaly pronikání fixačních činidel, a tudíž vnitřní struktury metacerkárií nebyly zachovány v dostatečné kvalitě pro studium (Obr. 31 A, B). Na několika zachovaných metacerkáriích bylo pozorováno výrazné otrnění těla metacerkárie, výrazné přísavky – ústní a břišní a také zárodečné buňky. Jednotlivé skupiny žláзовých buněk popisovaných u cercárie nebyly pozorovány – tyto produkty byly pravděpodobně využity při tvorbě jednotlivých ochranných obalů. Na preparátech pro TEM nebyly taktéž vnitřní struktury uspokojivě zachovány, a to ani při použití metod „High pressure freezing“ a kryo-substituce.

Ochranné obaly

Pomocí histologického barvení se podařilo odlišit celkem čtyři vrstvy ochranných obalů metacerkárie, pomocí SEM byly odlišeny tři a TEM pouze dvě. Také byly pozorovány metacer-



Obr. 30: Povrch a ochranné obaly metacerkárie (SEM)

A: Ventrální strana metacerkárie. B: Detail vnějšího povrchu metacerkárie C: Mechanicky odstraněný vnější obal s blanitou vrstvou. D: Vnitřní obal metacerkárie. a – ventrální zátka, b – granula ze žláz typu I, c – blanitá vrstva, d – houbovitý obal, e – vnitřní vrstva

kárie, jejichž obaly nebyly úplně formované.

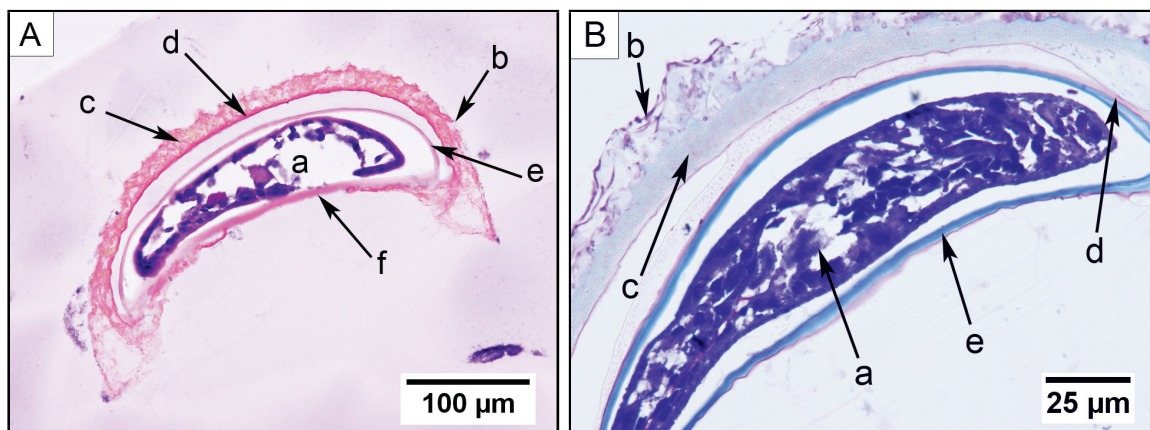
Na vnějším povrchu metacerkárie se toluidinovou modří metachromaticky barvila jasně neohraničená tenká vrstva mukoidního materiálu (Obr. 31 B). Tato vrstva se jako jediná nenacházela po celém obvodu metacerkárie, ale pouze v její dorzální oblasti. Znatelná byla i na některých řezech barvených PAS a H&E (Obr. 31 A). Pomocí SEM a TEM se tuto vrstvu nepodařilo dále charakterizovat.

Druhá vrstva ochranných obalů byla nejmohutnější a kryla metacerkárii po celém jejím obvodu, nejsilnější byla na dorzální straně a po jejích stranách, kde kotvila metacerkárii k podkladu. Tato vrstva se barvila toluidinovou modří světle modře a H&E růžově (Obr. 31 A, B). Na tvorbě této vrstvy se podílely granulární produkty cystogenních žláz typu I, které byly pozorovány na povrchu neúplně formovaných metacerkárií. Pomocí SEM i TEM byl zachycen proces tvorby tohoto obalu, ke kterému docházelo uvolňováním vláknitého materiálu z cystogenních granul (Obr. 30 B; 32 A). Pozorování povrchu metacerkárie pomocí

SEM odhalilo, že materiál tvořící tento obal je houbovitého charakteru (Obr. 30 B, D). Pouze v oblasti, kde se u encystující se cercárie nacházela ventrální přísavka, měl obal hladký povrch (Obr. 30 A).

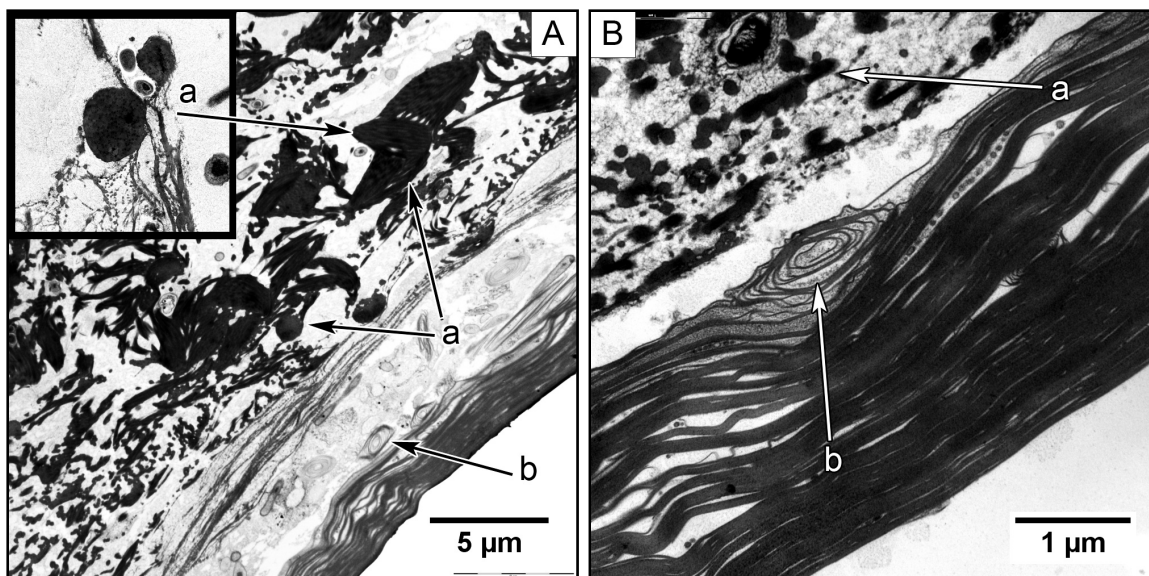
Třetí vrstvu se podařilo odlišit pomocí všech typů barvení. Toluidinovou modří se zbarvovala metachromaticky, byla PAS pozitivní a pomocí H&E bylo pozorováno slabě modré zbarvení (Obr. 31 A, B), což znamená, že zřejmě byla tvořena mukopolysacharidy. Tato tenká vrstva se nacházela po celém obvodu metacerkárie. Pomocí SEM byla u některých preparátů pozorována tenká blanka vystýlající vnitřní povrch přiléhající houbovitě vrstvy (Obr. 30 C).

Čtvrtá vnitřní vrstva, ohraničující samotné tělo metacerkárie, byla tvořena kompaktní vrstvou materiálu, která se barvila eosinofilně pomocí H&E a modře toluidinovou modří (Obr. 31 A, B). Ventrální část tohoto obalu, která byla mírně rozšířená, vykazovala PAS pozitivitu a barvila se výrazněji pomocí H&E (Obr. 31 A). Pomocí TEM nebyla pozorována strukturální odlišnost této odlišně barvitelné části obalu. Vnitřní obal byl tvořen vrstvami těsně k sobě přiléhajících lamel, které byly tvořeny rozvinutými lamelárními produkty cystogenních žláz (typu II) cercárie (Obr. 32 A, B). Na preparátech metacerkárií s mechanicky odstraněnými vnějšími vrstvami byl charakter vnitřního obalu pozorován i pomocí SEM. Jeho povrch byl hladký bez nerovností a prohloubenin (30 D).



Obr. 31: Histologické barvení ochranných obalů

A: Příčný řez metacerkárií (H&E). B: Příčný řez metacerkárií (toluidinová modř) a – metacerkárie, b – vrstva I, c – houbovitá vrstva II, d – vrstva III, e – vnitřní lamelární vrstva IV, f – ventrální oblast vrstvy IV.



Obr. 32: Ultrastruktura ochranných obalů (TEM)

A: Průřez obaly metacerkárie. Detail: Uvolňování cystogenního materiálu z granul typu I.
B: Detail vnitřního lamelárního obalu. a – tvorba vnější houbovitě vrstvy, b – rozvolňování lamelárních cystogenních produktů

5.1.8 Dospělec

Dospělci *F. magna* byli získáváni z disekované jaterní tkáně definitivních hostitelů, a to jak z místa definitivní lokalizace - jaterních pseudocyst, tak i z jaterního parenchymu, kde se nacházeli během migrace. Tímto způsobem byli získáni jedinci různého stáří a velikosti. Naměřená velikost dospělců byla průměrně 4 cm na délku a 2,5 cm na šířku ($n = 30$). Tělo dospělců bylo dorzoventrálně zploštělé, hnědočerveného zabarvení (Obr. 35 B). Tvar těla pozorovaných jedinců byl poměrně variabilní. Tělo bylo nejčastěji oválné se zaoblenou zadní částí a přední částí s absencí konusu, v některých případech však mírně vystupovala z oválného tělního obrysu.

Povrch dospělce

V přední části těla se nalézala ústní přísavka, která byla kruhovitěho tvaru s hladkým povrchem (Obr. 33 A). Za ústní přísavkou se nacházelo vyústění pohlavní soustavy a břišní přísavka. Povrch motolice byl, s výjimkou přísavek a cirru pokryt trny, jejichž tvar a velikost se lišily dle lokalizace na těle jedince. V přední části těla se nacházely spíše menší trny, zatímco v oblasti okolo vyústění pohlavní soustavy a břišní přísavky byly trny větší pilovitěho vzhledu s více hroty (4 – 12) (Obr. 33 E). Na bázi cirru byly pozorovány jednoduché trny (Obr. 33 B). Povrch samotného cirru byl hladký, při bližším pozorování pórovitý s hrbolovitými

tými výběžky (Obr. 33 D). Na ventrální straně těla kolem cirru byly mezi trny pozorovány nápadné skupinky senzorických papil (Obr. 33 B). Ventrální přísavka byla tvořena osvaleným valem (Obr. 33 A). Vnitřní povrch přísavky byl hladký a vyskytovaly se zde kopečkovité papily. Směrem k posteriorní části těla byly trny rozmístěny dále od sebe a postupně přecházely v jednoduché trny s jedním hrotem (Obr. 33 F). Na dorzální straně těla se také množství trnů zmenšovalo směrem k posteriorní části, kde se vyskytovaly jednoduché tupě zakončené trny. Vyústění exkrementní soustavy a Lauerova kanálu na povrch těla se pozorovat nepodařilo.

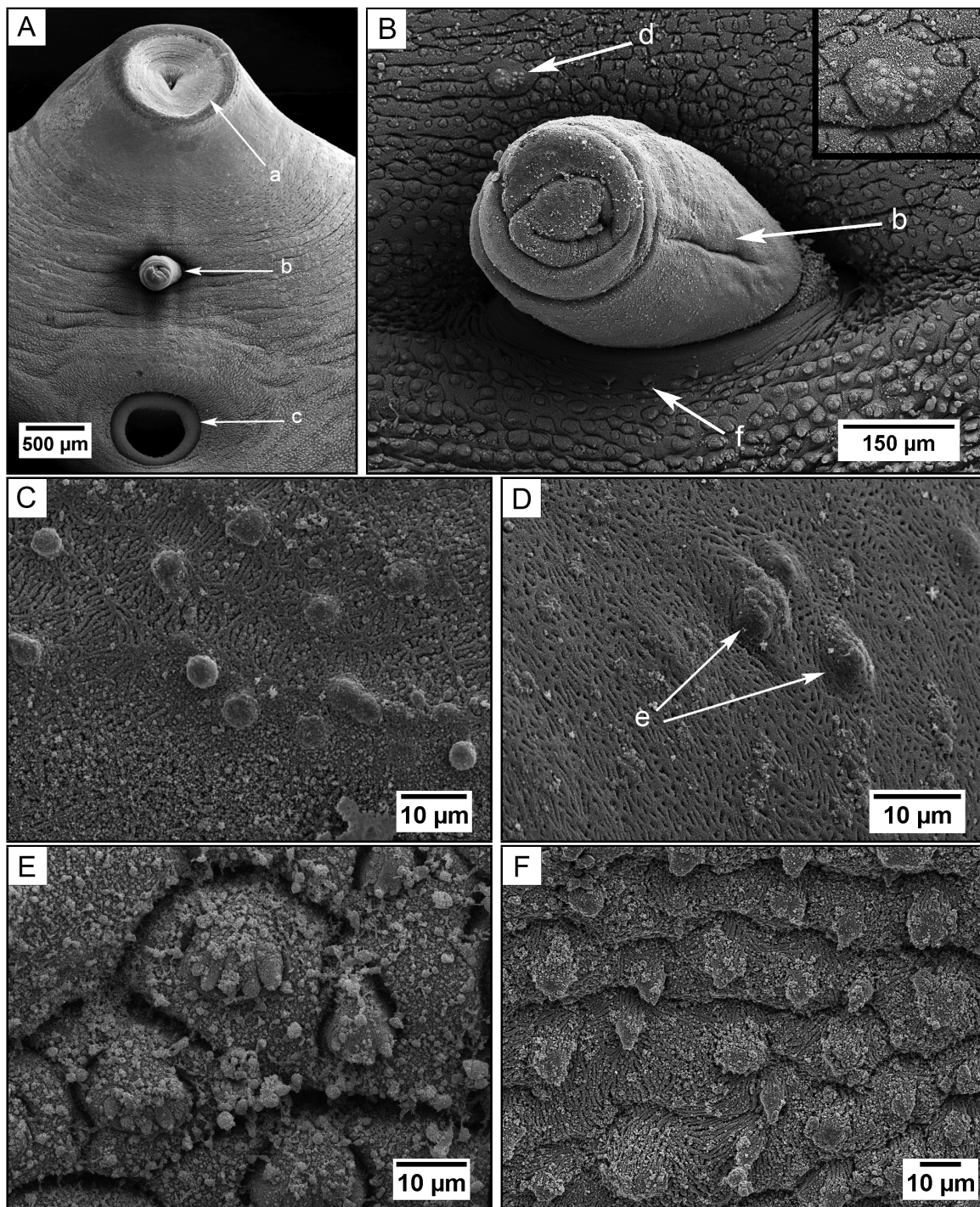
Senzorické struktury

U dospělců byly vzhledem k jejich velkým rozměrům pozorovány senzorické struktury pouze pomocí SEM. Na vnitřní straně ústní přísavky se nacházelo velké množství drobných kopečkovitých papil (33 C). Okraje břišní přísavky byly taktéž lemovány kopečkovitými aciliárními papilami. Mezi trny na ventrální straně těla se okolo cirru vyskytovaly skupinky papil, které se skládaly z drobných hemisférických výběžků, z nichž některé byly zakončeny velmi krátkou ciliární strukturou (33 B -detail).

Stavba těla

Vnější povrch těla byl tvořen syncytiální vrstvou tegumentu, který se H&E barvil výrazně eosinofilně (Obr. 34 C). Pomocí TEM bylo v cytoplazmě tegumentu pozorováno velké množství elektrondenzních granul bikonkávního tvaru a mitochondrií (Obr. 34 A). Vnější povrch tegumentu tvořil na povrchu motolice četné invaginace (Obr. 34 A). Pod tegumentem se nacházela bazální membrána a svalovina, mezi kterou byly pozorovány výběžky subtegumentálních buněk, kterých byly, dle výskytu elektrondenzních granul v jejich cytoplazmě, rozpoznány dva typy (Obr. 34 B). Granula prvního typu subtegumentálních buněk měla bikonkávní tvar a velikost 150 μm , granula druhého typu byla oválná a na délku měřila zhruba 400 μm .

Trávicí soustava dospělé začínala ústním otvorem asociovaným s ústní přísavkou v přední části těla a dále pokračovala prepharyngem, pharyngem a oesophagem na který navazovalo střevo. Střevo se dělilo před acetabulem do dvou velkých větví, které se dále větvily do mnohočetných výběžků prostupujících celým tělem (Obr. 34 C). Přední část trávicí soustavy byla kryta tegumentem, který volně navazoval na tegument přísavky (Obr. 34 A), vlastní střevní epitel byl tvořen separátními epitelovými buňkami. Místo přechodu tegumentu ve střevní epitel se nepodařilo přesně určit. Epitel střeva byl kubický až kolumnární a H&E se barvil bazofilně (Obr. 34 C). Apikální část střevního epitelu vybíhala do lumen střeva v podobě dlouhých, tenkých mikrovilů, jejichž tvar se lišil v různých částech střeva. V cytoplazmě buněk bylo pozorováno mohutné endoplazmatické retikulum. Buňky střevního epitelu byly



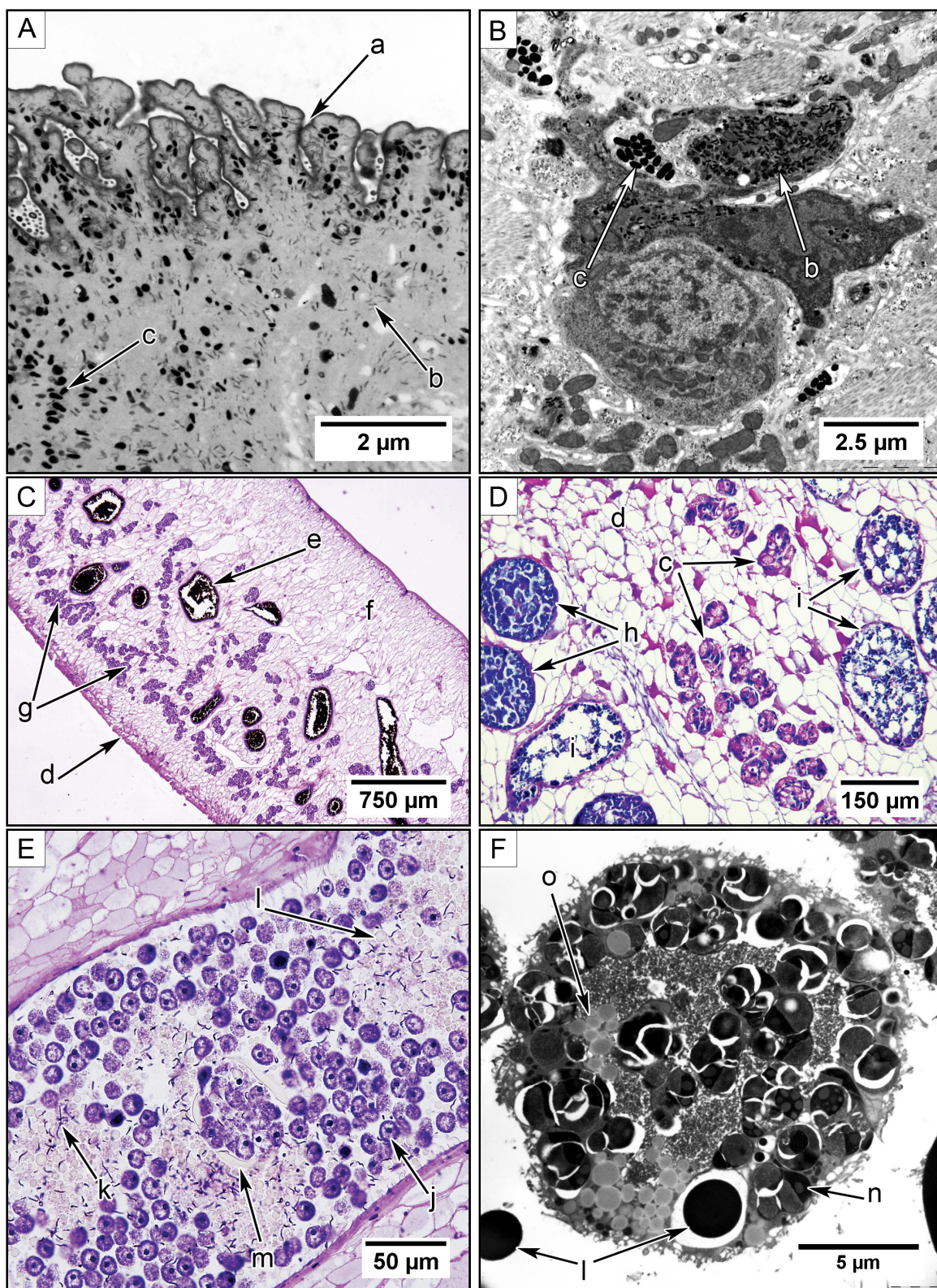
Obr. 33: Povrch dospělce (SEM)

A: Ventrální strana těla dospělce. B: Cirrus. Detail: Skupina senzoričských papil u cirru. C: Senzorické papily na ústní přísavce. D: Detail povrchu cirru E: Otrnění v midventrální části těla; F: Otrnění v posteriorní části těla. a – ústní přísavka, b – cirrus, c – břišní přísavka, d – skupinka papil, e – výběžky na cirru, f – jednoduché otrnění u cirru.

vypodloženy bazální laminou, pod kterou se nacházela svalovina. Prostor mezi větveným střevem a dalšími vnitřními orgány vyplňovaly parenchymatické buňky, které měly kulovitý nebo oválný tvar (Obr. 34 C). Pomocí PAS se některé oblasti parenchymu barvily růžově a pomocí TEM v nich byly pozorovány rozety glykogenových granul.

Dospělí jedinci jsou hermafrodité, přičemž pohlavní soustava prostupovala téměř celým tělem. Samčí část pohlavní soustavy se skládala z rozvětvených varlat (Obr. 34 D), která byla pozorována na ventrální části těla v oblasti za acetabulem. V parenchymu byly pozorovány průřezy ductů vedoucích až k cirrové kapse, která obsahovala seminální váček se spermii. Spermie byly podlouhlého tvaru (Obr. 34 E). Dále se zde nacházela prostatická žláza, která se strukturně podobala Mehlisově žláze. Samčí pohlavní soustava byla zakončena osvaleným zatažitelným cirrem.

Samičí část pohlavní soustavy byla tvořena větveným ováriem (germáriem) umístěným před testes, mírně vpravo mimo středovou osu těla. Zralé oocyty měly velké jádro s výrazným, excentricky umístěným jadérkem a malé množství cytoplazmy. Na ventrální straně dospělého červa byly pozorovány vitelinní žlázy (Obr. 34 C), rozkládaly se v zadní části těla za břišní přísavkou. V okrajových částech těla, zejména pak v jeho zadní části vitelinní žlázy, v některých případech dosahovaly téměř až k dorzální stěně červa. Ve viteláriích se nacházely vitelinní buňky s denzním kulatým jádrem (Obr. 34 D, E). Zralé vitelocyty se duktem přesouvaly do zásobní vitelinní ampule, která ležela u Mehlisovy žlázy. Mehlisova žláza obklopovala ootyp, pomocí barvení H&E u něj byly odlišeny dva typy buněk - distálně se nacházely větší, bazofilně se barvící buňky, blíže ležely menší eosinofilně se barvící buňky. Ootyp byl vystlán epitemem, který do lumen vybíhal v podobě dlouhých tenkých výběžků. V ootypu bylo pozorováno započetí formace vajíček, které se dále kličkovitým uterem přesouvaly až k vyústění nacházejícího se u vyústění samčí pohlavní soustavy. Proces tvorby vajíček byl charakterizován uvolněním obsahu vitelinních buněk v podobě velkého množství opalescentních prekurzorů (Obr. 34 E), ze kterých se zformovala vaječná stěna okolo oocytu a vitelinních buněk. Pomocí TEM byly v cytoplazmě vitelinních buněk dále pozorovány lipidické kapénky a zásobní vezikuly s glykany (Obr. 34 F).



Obr. 34: Dospělý jedinec stavba těla

A: Tegument v oblasti ústní přísavky. B: Subtegumentální buňky. C: Příčný řez tělem dospělé motolice (H&E). D: Podélný řez tělem dospělé motolice (PAS). E: Formace stěny vajíček (H&E). F: Vitelinní buňka (TEM). a – invaginace tegumentu, b – subtegumentální granula 1, c – subtegumentální granula 2, d – tegument na ventrální straně těla, e – střevo, f – parenchym, g – vitelária, h – ovárium, i – testes, j – vitelinní buňka, k – spermie, l – prekurzory vaječné stěny, m – formace vaječné stěny, n – zásobní vezikula, o – lipidická kapénka.

5.2 Patogenní působení *F. magna*

Během let 2010 - 2012 byly získány vzorky jater z přirozeně nakažených definitivních hostitelů: jelen lesní (*Cervus elaphus*), jelen sika (*Cervus nippon*), daněk obecný (*Dama dama*), býk plemene "Highland cattle" (*Bos Primigenius f. taurus*). V laboratorních podmínkách proběhla experimentální nákaza laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*).

5.2.1 Přirozeně infikovaní hostitelé

Získaný materiál tvořil širokou škálu vzorků jaterní tkáně v různé fázi probíhající infekce *F. magna*. Pozorována byla tkáň s migrujícími juvenilními motolicemi, počátek tvorby pseudocyst i plně formované pseudocysty s dospělci. V průběhu prováděné studie se nepodařilo pro porovnání získat plně formovanou pseudocystu z býků, navíc v obou případech byl dobytek silně koinfikován motolicí *F. hepatica*.

Makroskopické pozorování napadených jater

Během studie byla získána napadená játra o různé intenzitě nákazy, čemuž odpovídal i jejich celkový vzhled. Mezi nejčastěji pozorované projevy infekce patřilo zvětšení jater, která měla neostře vyrýsované okraje laloků (Obr. 35 A). V různé míře bylo změněno i jejich zbarvení. U slabých nákaz svědčila o přítomnosti parazita sporadicky se vyskytující tmavá ložiska pigmentu ve tkáni. Některá ložiska byla mírně vkleslá pod úroveň povrchu jater. V případech silnějších nákaz, pozorovaného zejména u starších kusů jelenů a desetileté daněly, byly zaznamenány rozsáhlé tmavě zbarvené plochy povrchu (Obr. 35 A).

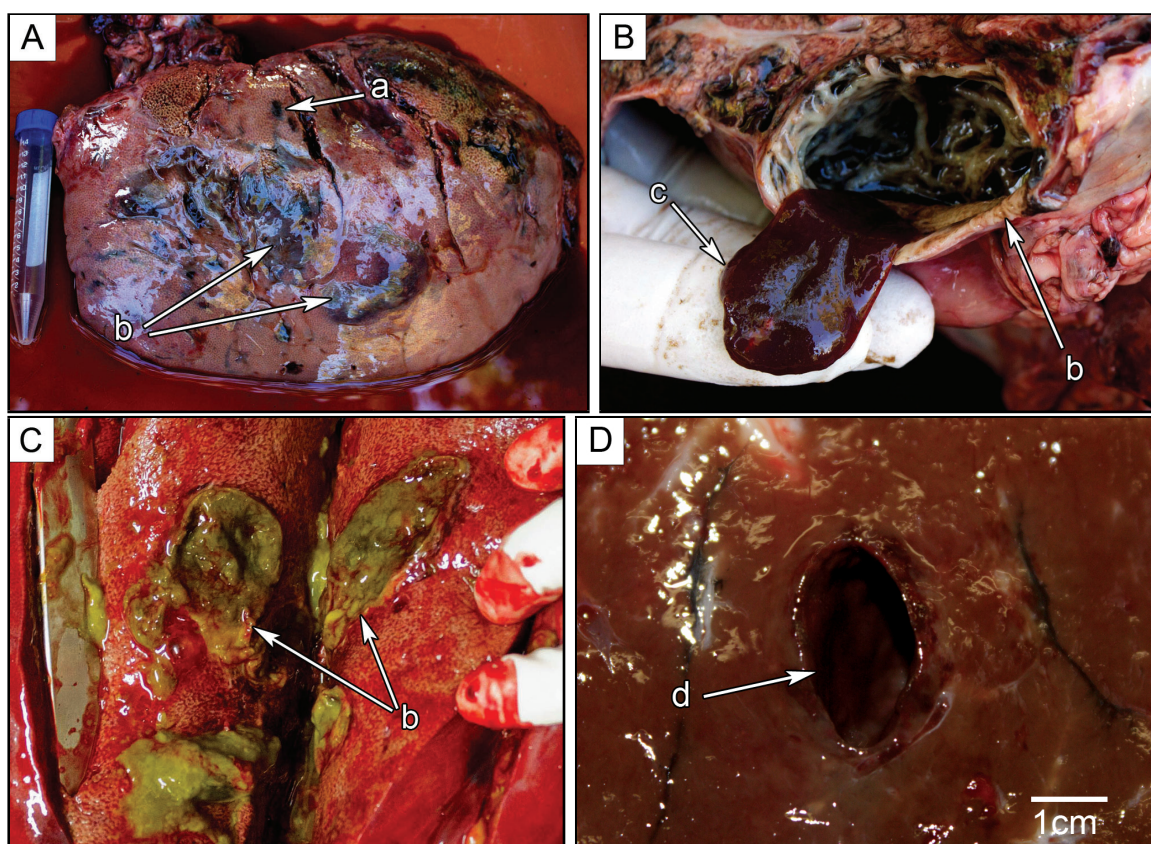
Poměrně často byl povrch jater u jelenovité zvěře boulovitě vyklenut, tyto útvary, které byly až několik centimetrů velké, na ohmat fluktuovaly. Při jejich rozříznutí pak bylo zjištěno, že vybouleniny jsou tvořeny prostornými kavitacemi způsobenými přítomností motolice (Obr. 35 B). V dutinách pseudocyst byli pozorováni jedinci motolic v počtu od jednoho do tří kusů. Dutiny byly kromě červů vyplněny hnědou tekutinou, ve které se nacházelo velké množství vajíček. V několika případech byly u jelení zvěře nalezeny pseudocysty obsahující vazkou žlutavou tekutinou s pozůstatky rozložených motolic (Obr. 35 C). U jelenů byly také nacházeny cystovité útvary, které byly na omak tvrdé, na řezu byly uvnitř vyplněné tuhým hnědým drobným materiálem.

Tyto kavitace (pseudocysty), kulovitě až oválného průřezu, se nacházely i hlouběji pod povrchem v jaterní tkáni. Jejich stěny byly tvořeny vrstvou vazivové tkáně, která je oddělovala od okolního jaterního parenchymu. Pseudocysty byly nacházeny v různém stádiu formování. Novotvořené, mladší pseudocysty, měly stěnu tvořenou pouze malým množstvím vaziva, často tmavě hnědého zbarvení. Dále byly pozorovány „zralé“ pseudocysty, jejichž

stěny byly tvořeny vyzrálým bělavým vazivem. Vnitřní povrch formovaných pseudocyst pozorovaných u jelenů a daňků měl vrásnitou strukturu tvořící mělké prohlubně (Obr. 35 B). Při zběžném ohledání stěn pod binolupou nebyly pozorovány žádné vývody.

Samotný parenchym jater byl protkán četnými hemoragiemi, způsobenými migrujícími motolicemi (Obr. 35 D). Tyto hemoragie se vyskytovaly i u slabých infekcí a byly pro infekci *F. magna* charakteristické.

V případě jater získaných z býků byly pozorovány výrazné patologické změny žlučových. Stěny žlučových byly výrazně fibroticky zbytnělé a kalcifikované. V lumen bylo nalezeno velké množství jedinců motolice *F. hepatica* (cca 300 ks). V tomto případě se jednalo o unikátní případ koinfekce.



Obr. 35: Makroskopické změny jater (Fotografie J. Pankrác, M. Kašný)

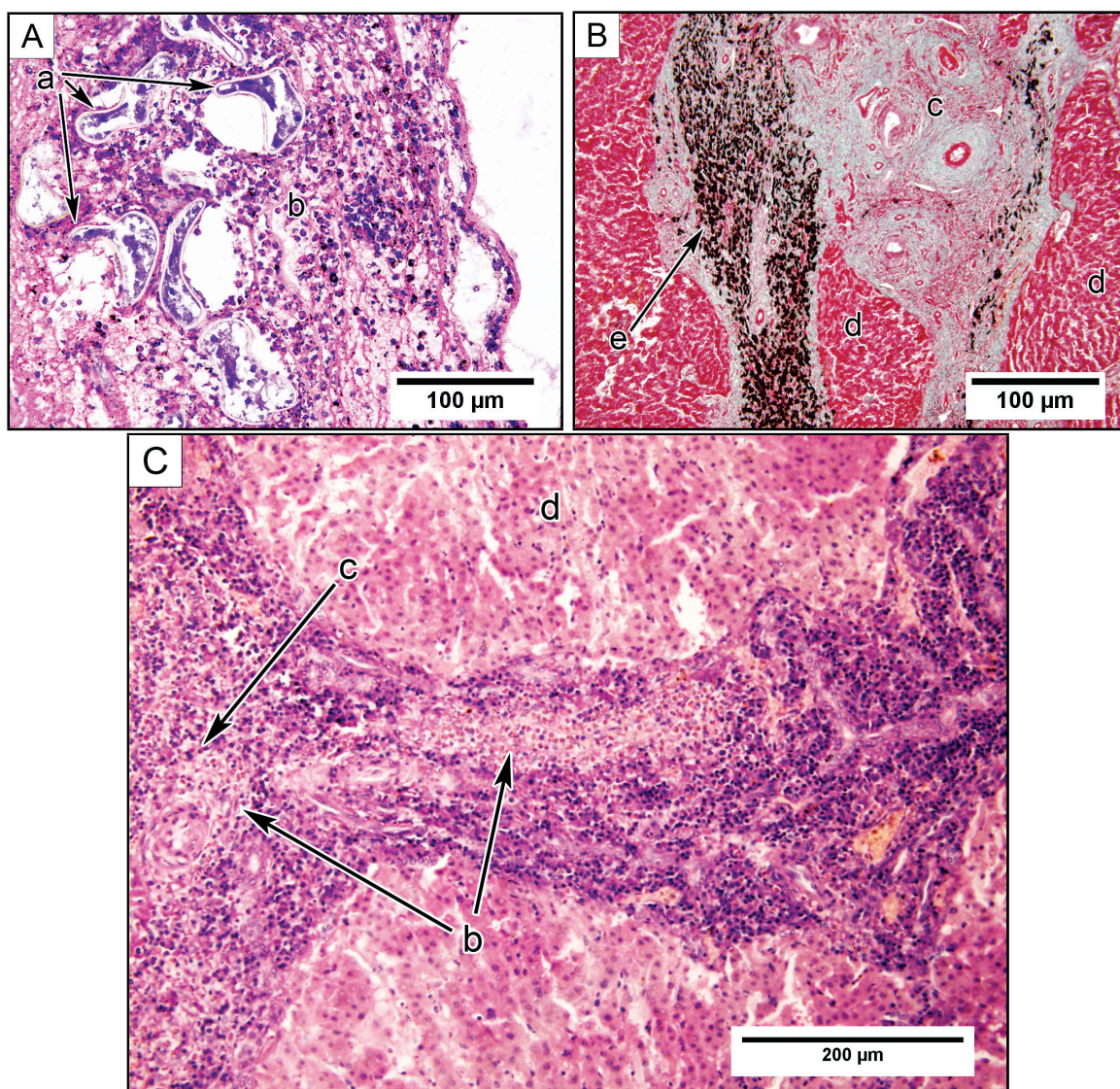
A: Napadená játra (jelen). B: Řez játry a pseudocystou s motolicí (jelen), C: Řez pseudocystou s nekrotickým obsahem (jelen). D: Migrační kanálek (býk). a – pigmentace, b – pseudocysta, c – motolice, d – migrační kanál

Histopatologie jater

Během pozorování získané jaterní tkáň zpracované pomocí histologických metod bylo odhaleno, že mikroskopická struktura jaterní tkáň byla v průběhu infekce *F. magna* v různé míře narušena. Oproti zdravé tkáni bylo pozorováno několik charakteristických změn: mechanické poškození tkáň migrujícími červy s následnou nekrózou, dále zánětlivé a granulomatózní reakce a s tím související značný úbytek funkčního parenchymu.

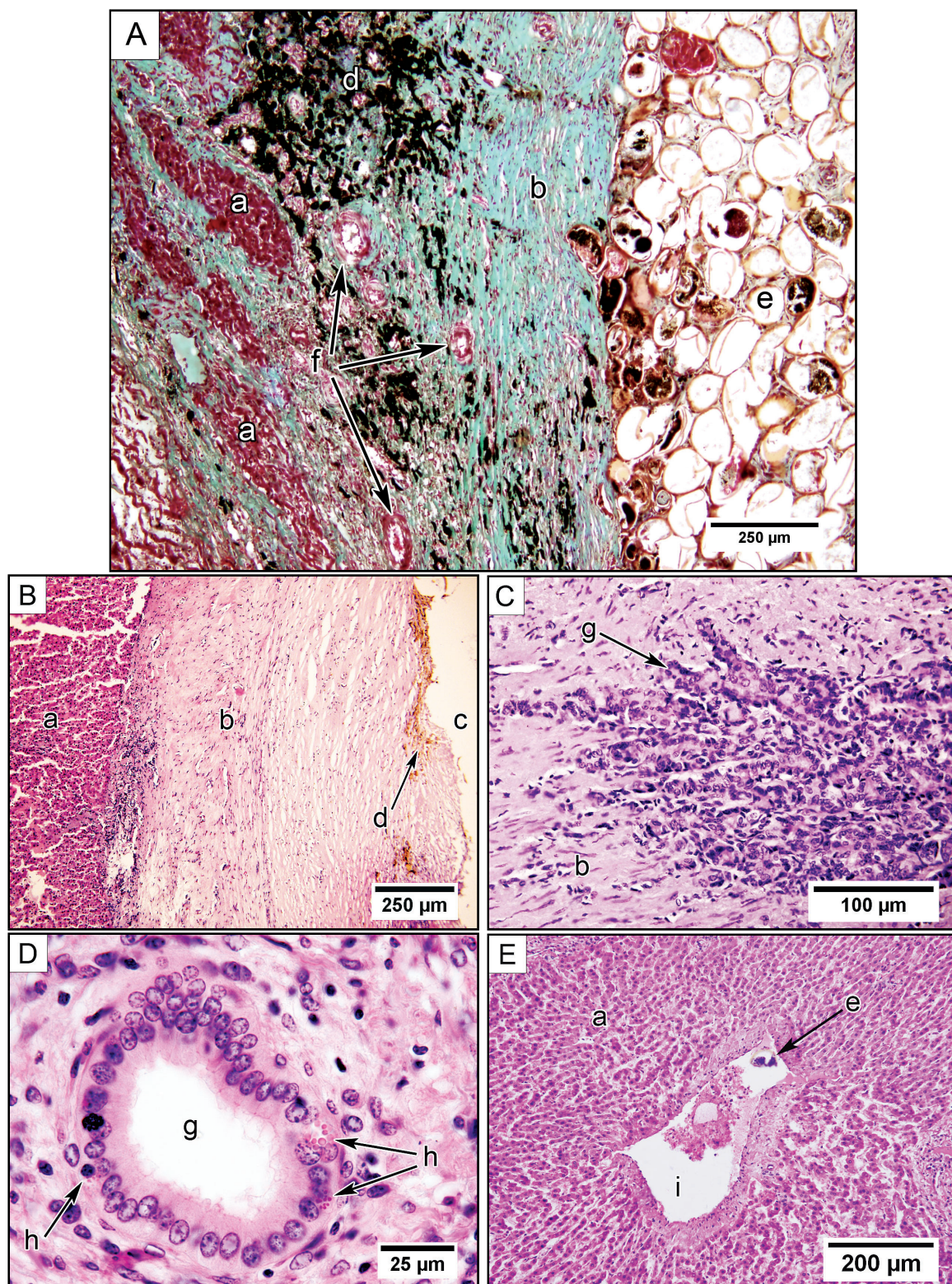
Migrační kanály

Migrující červi mechanicky výrazně destruovali architekturu jaterní tkáň. V čerstvých migračních cestách a na jejich okrajích se nacházela celulární debris tvořená směsí odumřelých hepatocytů, tmavého pigmentu, erytrocytů, makrofágů a eosinofilů. V těsně přiléhající tkáni se nacházely nekrotizující hepatocyty s eosinofilní cytoplazmou nebo pouze jejich bezjaderné pozůstatky, dále pak i nekrotizující žlučovody. V případě, že migroval i pohlavně dospělý jedinec motolice, což bylo pozorováno u všech hostitelských druhů, byla v lumen migračních kanálů a v přilehlé tkáni nacházena i vajíčka (Obr. 36 A). Migrací byl často přímo zasažen i cévní systém a docházelo tak k výlevu krve do okolní tkáň. Ve vzorcích jater z býků byly pozorovány v blízkosti migračních kanálů trombózy. Akutní zánětlivá reakce objevující se v důsledku přítomnosti parazita byla tvořena infiltrátem polymorfonukleárních leukocytů s převahou eosinofilů (Obr. 36 A). Přítomny byly i makrofágy, které se podílely na odstraňování debris a pigmentových částic. Přilehlé portobilární prostory a zejména cévy byly edematózní a obsahovaly ve velkém množství infiltráty zánětlivých buněk (Obr. 36 C). V některých částech kanálů byla pozorována proliferační aktivita fibroblastů s produkcí vazivové tkáň. Jaterní parenchym byl protkán četnými různě širokými pruhy vazivové tkáň nacházející se často v blízkosti žlučodů a cév, způsobených migrací červů. Ve vazivové tkáni bylo často deponováno velké množství pigmentu (Obr. 36 B) a v některých případech i vajíčka.



Obr. 36: Histologické pozorování napadené tkáně

A: Stěna migračního kanálu s deponovanými vajíčky (býk). B - Fibróza portobiliárního prostoru (býk). C - Akutní zánětlivá infiltrace portobiliárního prostoru eosinofily (jelen). a – vajíčko, b – zánětlivý infiltrát, c – portobiliární prostor, d – jaterní parenchym, e – pigment po migraci



Obr. 37: Histologické pozorování napadené tkáně

A: Příčný řez stěnou pseudocysty s deponovanými vajíčky a pigmentem (jelen). B: Příčný řez stěnou pseudocysty a přilehlou jaterní tkání (jelen). C: Kompenzační hyperplazie žlučových (jelen). D: Příčný řez žlučovodem s buňkou obsahující eosinofilní granula (býk). E: Vajíčko v centrální větě (býk) a – jaterní parenchym, b – fibrózní stěna pseudocysty, c – lumen pseudocysty, d – pigment, e – vajíčko, f – artérie, g – žlučový kanálek, h – globulární leukocyt, i – centrální žíla

Pseudocysty

Během pozorování byl zaznamenán, pro infekci *F. magna* typický, výskyt pseudocyst, které byly od okolní tkáně odděleny i makroskopicky pozorovatelnou stěnou. Pozorované stěny pseudocyst byly tvořeny uspořádanými vlákny vazivové tkáně s periferně lokalizovaným těly fibroblastů (Obr. 37 A, B). Šířka stěn se lišila i v rámci druhů i jednotlivých pseudocyst v rámci jednoho kusu zvířete. Maximální pozorovaná tloušťka stěny u jelenovitých se však pohybovala okolo 1 mm. U některých cyst jelenů byl ve stavbě stěny znatelný přechod, kdy vnější část obsahovala četné fibroblasty, zatímco vnitřní (blíže lumen) byla acelulární a tvořena pouze vazivem (Obr. 37 B). Ve stěnách mezi vazivovým materiálem byl často deponován pigment a vajíčka, která se nacházela zejména na vnitřní části pseudocysty; u jednoho jelena byla pozorována souvislá neobvykle silná vrstva vajíček deponovaných mezi fibroblasty (Obr. 37 A).

Ve vazivové tkáni stěn byly na průřezích pozorovány četné cévy (Obr. 37 A) a i malé žlučovody, které byly obklopeny pojivovou tkání, některé z nich jevíly známky atrofie. Zároveň byl v pojivové tkáni pozorován výskyt nově utvořených žlučovodů (kompenzační hyperplazie) (Obr. 37 C). V lumen žádného z pozorovaných žlučovodů nebyla zachycena vajíčka. Hepatocyty ležící v těsné blízkosti stěny formované pseudocysty nejevily známky poškození (Obr. 37 B).

Pozorované zánětlivé reakce v okolí pseudocyst měly chronický charakter - v tomto stádiu infekce většinou vymizely infiltráty polymorfonukleárních leukocytů a pozorovány byly lymfocyty a plazmatické buňky. Ve stěnách pseudocyst byla pozorována ložiska zánětlivých infiltrátů lymfocytárního charakteru. V epitelu žlučovodů byly u býků pozorovány velké buňky s excentricky lokalizovaným jádrem a velkými eosinofilními granuly v cytoplazmě (v literatuře uváděny jako tzv. globulární leukocyty) (Obr. 37 D).

V několika případech bylo u jelenů i u býka nalezeno vajíčko v lumen centrální vény (Obr. 37 E). Vzhledem ke koinfekci *F. hepatica*, nebylo u histologických řezů z býků možné určit, o vajíčko kterého druhu motolice se jednalo. Koinfekce u býků komplikovala i interpretaci celkových histopatologických změn způsobených přímo *F. magna* v jaterní tkáni. Portobiliární prostory i cévní systém byl však oproti změnám u jelenovité zvěře výrazněji fibrotizovaný (Obr. 37 C).

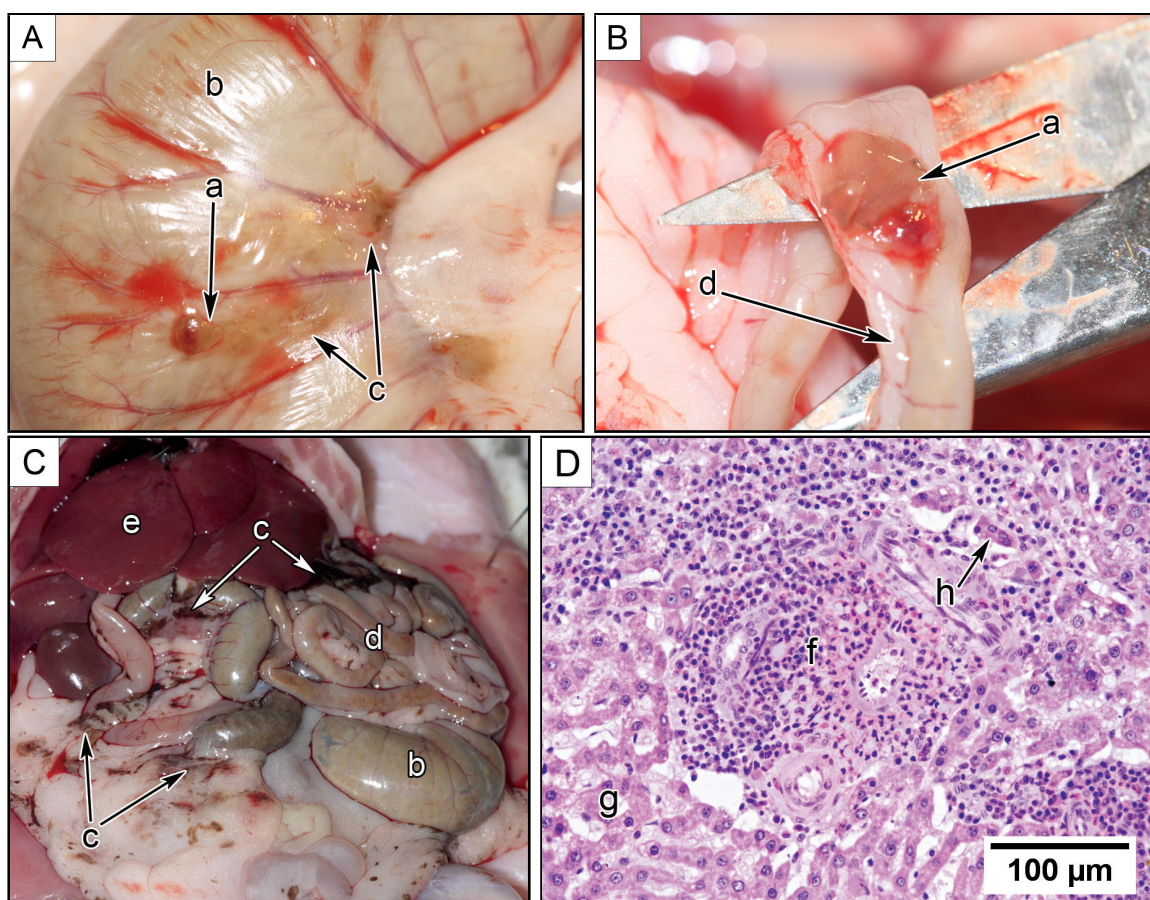
5.2.2 Experimentální infekce potkanů

Experimentálně nakažení potkani byli pitváni v časovém intervalu 58 a 92 dnů po infekci (dpi.). Oba jedinci po celou dobu nákazy nejevili žádné známky onemocnění. Během pitvy byly v obou případech nalezeny živé motolice, jejichž střevo obsahovalo přijatou potravu. U potkana pitvaného 58 dpi. se dvě motolice o velikosti 5 mm nacházely pod serózní vrstvou

tenkého a tlustého střeva (Obr. 38 A, B). V druhém případě (92 dpi.) byla motolice o velikosti 11 mm nalezena volně v levém horním kvartálu břišní dutiny. V břišní dutině se roztroušeně vyskytovaly zbytky natrávené krve a vazivové srůsty orgánů způsobených zánětlivou reakcí (Obr. 38 C).

Na histologických řezech získanými motolicemi bylo prokázáno, že ani jedna nedosáhla v průběhu migrace pohlavní dospělosti a nedocházelo tak ani k produkci vajíček.

Histologická analýza jater odebraných z obou potkanů vyloučila migraci motolic jaterní tkáně. Jaterní tkáň potkana (92dpi.) nevykazovala patologické změny. U potkana pitvaného 58 dpi. byl však pozorován průběh akutní zánětlivé reakce (Obr. 38 D).



Obr. 38: Pitva potkanů

A: Motolice v subseróze tlustého střeva. B: Motolice v subserózním prostoru tenkého střeva. C: Břišní dutina se zbytky natrávené krve. D: Histologický obraz jater potkana 58 dpi. a – motolice, b – tlusté střevo, c – krevní trávenina, d – tenké střevo, e – játra, zánět portobiliárního prostoru, g – jaterní parenchym, h – nekrotické hepatocyty

6 Diskuze

6.1 Morfologie vývojových stádií

Vajíčko

Vajíčka *F. magna* jsou oválného tvaru s víčkem. Námi naměřené velikosti vajíček (průměr 154 x 96 μm) se pohybovaly v souladu s dříve publikovanými údaji (délka 124 – 175 μm a šířka 81 – 117 μm) (Swales, 1935; Campbell, 1961; Erhardová-Kotrlá, 1971). Na základě velikosti nelze vajíčka *F. magna* spolehlivě odlišit od vajíček *F. hepatica*. Vajíčka *F. hepatica* jsou sice menší, v průměru měří 130 μm na délku a 80 μm na šířku, ale i u tohoto druhu se vyskytuje velká variabilita v rozměrech (105 – 145 μm x 66 – 99 μm) zapříčiněná např. typem hostitele, která může způsobit záměnu vajíček zmíněných motolic (Thomas, 1883; Abrous *et al.*, 1998).

Povrchové charakteristiky vajíček *F. magna* pozorované pomocí SEM se téměř shodují s údaji o *F. hepatica*, v jejich popisu povrchu vajíček však chybí zmínky o výskytu aboperkulárního výběžku (Køie *et al.*, 1976). U *F. magna* byl tento výběžek pozorován hned několika autory (Swales, 1935; Campbell, 1961; Erhardová-Kotrlá, 1971). Swales (1935) se domníval, že se jedná o výběžek protoplasmu zevnitř vajíčka. Z našich pozorování však vyplývá, že se jedná o výběžek skořápky vajíčka. Tyto výběžky byly pozorovány zejména u vajíček nacházejících se v uteru dospělých motolic, na rozdíl od vajíček získaných z pseudocyst, kde se nacházely jen v malém množství. Přítomnost výběžků přítomných u vajíček získaných z jaterních pseudocyst, je možné vysvětlit také tak, že během pitvy jater byly motolice poškozeny a vajíčka tak uvolněna z jejich těla. Domníváme se, že po vyloučení vajíčka z uteru motolice dojde ve většině případů k odlomení tohoto výběžku, což potvrzuje přítomnost „jizvy“, kterou jsme také pozorovali v místě výběžku pomocí SEM.

Vznik a funkce výběžku nebyly u *F. magna* popsány. Invaginace povrchu a hrbolek („knob“) byly také pozorovány na aboperkulární straně vajíček u *F. gigantea* a *echinostom* (Krejci a Fried, 1994; Hussein *et al.*, 2010). V případě studie vajíček *echinostom* se autoři domnívali, že v místě hrbolku je vajíčko připojeno v průběhu formace na ootyp (Krejci a Fried, 1994).

Další výrazný rozdíl pozorovaný mezi vajíčky získanými z uteru motolic a těmi z pseudocyst trusu byla odlišná barva, což ve své studii zmiňuje i Campbell (1961). Podle poznatků týkajících se jiných druhů motolic ke změně barvy vajíček dochází díky tzv. vytvrzení stěny

vajíček, což je děj podobný tvorbě kutikuly u hmyzu („tanning systém“) (Smyth a Halton, 1983).

Stěna vajíček *F. magna* je dle literatury až tři mikrometry silná rigidní struktura (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). u tloušťky stěny vajíček *F. hepatica* je v literatuře však udáván rozměr pouze 1,2 – 1,5 μm (Kø ie *et al.*, 1976). Vlastní ultrastruktura stěny vajíček se v našich pozorováních shodovala s poznatky o *F. hepatica* - stěna je tvořena homogenním materiálem retikulárního vzhledu, jejichž vnitřní a vnější vrstva mají odlišnou elektronovou denzitu (Wilson, 1967).

Hlavní část stěny vajíčka je tvořena materiálem z prekursorů vitelinních buněk. Tvorba vaječné stěny byla již dříve prozkoumána u *F. hepatica* a bylo zjištěno, že proteinové prekurzory z vitelinních buněk se za pomoci produktů Mehlisovy žlázy shlukují a tvoří střední vrstvu stěny, zatímco vnitřní a vnější vrstvy jsou zřejmě produkty Mehlisovy žlázy (Irwin a Threadgold, 1972). Mikroskopické pozorování vnitřních struktur jak na histologických preparátech, tak i pomocí TEM bylo problematické, neboť vnitřní struktury vajíček ve většině případů nebyly zachovány v dobrém stavu. Při studiu ultrastruktury vajíček *Schistosoma japonicum* se osvědčila metoda „High pressure freezing“ v kombinaci s mrazovou substitucí (Jones *et al.*, 2008). Během zamrazení za vysokého tlaku totiž nevznikají ledové krystaly, díky čemuž nedochází k narušení ultrastruktury a stále za nízké teploty ($< -80\text{ }^{\circ}\text{C}$) dojde k fixaci a prosycení vzorku pryskyřicí. S našimi vzorky však ani touto metodou nebylo dosaženo uspokojivých výsledků. Vnitřní struktury vajíček byly lépe pozorovatelné v průběhu jejich formace v uteru motolice, z čehož se lze domnívat, že plně formovaná stěna vajíčka zabráňuje průniku fixačních činidel do vajíčka. Nicméně u *F. hepatica* bylo zjištěno, že samotná stěna vajíčka propouští látky o nízké molekulové hmotnosti a hlavní bariéru v propustnosti tak zřejmě tvoří vrstva vystýlající vnitřní povrch vajíčka (Wilson, 1967).

Miracidium

Povrch miracidíí je pokryt epiteliálními destičkami nesoucími cilie, jejichž uspořádání je charakteristické pro jednotlivé taxony (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Miracidia *F. magna* mají na svém povrchu destičky uspořádány v pěti řadách následovně: 6, 6, 3, 4 a 2 a shodují se tak se vzorcem uspořádání destiček u miracidíí *F. hepatica* (Kø ie *et al.*, 1976). Wilson (1969a) pozoroval, že vnější vrstva miracidia *F. hepatica* obsahovala kyselé mukopolysacharidy, což odpovídá i našemu pozorování, kdy se tato vrstva barvila metachromaticky toluidinovou modří. Při ultrastrukturálním studiu povrchu miracidíí jsme však nenalezli odlišnosti ve složení v této jinak barvitelné části. Ve studii o *F. hepatica* nebyla funkce této jinak barvitelné vrstvy objasněna, Wilson (1969a) se domníval, že se jedná o ochrannou vrstvu, které se na povrch miracidia uvolňuje z mezibuněčných valů. Mezibuněčné valy, které se nacházejí mezi jednotlivými destičkami, v cytoplazmě obsahovaly mitochondrie, malá kulatá

elektrondenzní granula a podlouhlá membranózní tělíska. K původu a funkci granul a membranózních tělísek se v literatuře vyskytují různé názory. [Wilson \(1969b\)](#) se domníval, že membránové struktury ve valech *F. hepatica* jsou pozůstatky vyprázdněných kulatých elektrondenzních granul ze subtegumentálních (vezikulárních) buněk. Naopak [Southgate \(1970\)](#) uvádí, že vzhledem k přítomnosti denzích granul také ve valech nedochází ke vzniku membranózních tělísek jejich vyprazdňováním, ale že tyto membranózní tělíska mají funkci zásobárny membrán využitých při expanzi valů a tvorbě tegumentu v průběhu přeměny na sporocystu. Při našich pozorováních se granula nalézala v menším počtu i v mezibuněčných valech, u některých z těchto granul bylo pozorováno zplošťování, nicméně vznik membranózních tělísek tímto způsobem nelze potvrdit. Granula se vyskytují i v tegumentu sporocyst, zatímco membranózní tělíska se v něm téměř nevyskytují, je tedy možné, že došlo k jejich využití při tvorbě tegumentu, jak se již dříve domníval [Southgate \(1970\)](#).

V přední části těla miracidia *F. magna* se nachází apikální papila. [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#) pozorovala, že skrz tuto papilu vyústí apikální žláza, která je v místě vyústění úzká a rozšiřuje se směrem do těla. Proces penetrace miracidia do plže, při kterém je apikální žláza využívána, je jeden z mála aspektů biologie *F. magna*, který byl detailně charakterizován i prostřednictvím elektronové mikroskopie ([Coil, 1977, 1981](#)). V práci [Coil \(1981\)](#) byly popsány dva typy penetračních žláz, které byly nalezeny i v případě našeho pozorování. Umístěním i velikostí odpovídaly žlázám penetračního aparátu *F. hepatica* ([Wilson, 1971](#)). [Coil \(1981\)](#) pozoroval, že v průběhu penetrace do plže hrají významnou roli produkty buněk, jež nazýval „vesiculated cells“ a které se značně podobají granulům v mezibuněčných valech. Tento autor nicméně udává, že mezi těmito dvěma typy granul se vyskytují morfologické odlišnosti, neudává však jaké. V našem pozorování, ani v pozorování provedeném [Wilson \(1971\)](#) se významné odlišnosti mezi těmito granulami nalézt nepodařilo. Jediný rozdíl je tedy ve formě vyústění, vývody těchto buněk nevedou do mezibuněčných valů, ale ústí na bázi apikální papily mezi svaly. Po stranách apikální žlázy byly dále nalezeny podlouhlé párové žlázy, u kterých se nepodařilo určit, zda se jedná o jeden nebo více párů. [Coil \(1981\)](#) tyto žlázy u miracidia *F. magna* na rozdíl od [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#) ve své publikaci vůbec nezmiňuje, což je vzhledem k jejich velikosti a přítomnosti velkého množství výrazných oválných granul poněkud zvláštní. Vzhledem k absenci těchto žláz u sporocysty se lze domnívat, že jejich produkty hrají také úlohu při penetraci. U *F. hepatica* byly tyto žlázy také přítomny a je udáváno, že se okolo apikální žlázy vyskytují ve více párech ([Wilson, 1971](#)). Za žláзовým aparátem se nachází velké „hlavové“ ganglion, od kterého vedou výběžky k četným senzorickým orgánům. Senzorické orgány jsou lokalizovány v přední části těla miracidia, a to na povrchu apikální papily a dále pak v mezibuněčných valech mezi první a druhou řadou epiteliálních destiček. [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#) ve své práci výskyt senzorických orgánů ve valech zmiňuje, nicméně jejich podrobnější popis chybí. K lokalizaci senzorických struktur byla

využita metoda impregnace stříbrem, pomocí které se jednotlivé receptory podařilo lokalizovat i mezi hustou povrchovou ciliaturou. Touto metodou se značí zejména povrchové ciliární receptory, nicméně značení není zcela specifické a dochází i ke zvýraznění jiných struktur, např. žláзовých vývodů (Wilson, 1970). Pomocí stříbra tak byly značeny i vývody exkretčních duktů, které ústily v mezibuněčných valech před poslední řadou epiteliálních destiček, stejně jako u *F. hepatica* (Wilson, 1969b). Za účelem rozlišení senzorických struktur od výše zmíněných vývodů a jejich detailní popis jsme provedli pozorování pomocí elektronové mikroskopie, jehož výsledky z velké části odpovídají poznatkům již publikovaných o receptorech u *F. hepatica* (Wilson, 1970; Kø ie et al., 1976). Na apikální papile *F. hepatica* byly pozorovány ciliární receptory, které se vyskytovaly jednotlivě nebo ve skupinkách v počtu od jednoho do osmi, bilaterálně souměrně po stranách vyústění žláz, které se nacházelo uprostřed apikální papily (Wilson, 1970). Na apikální papile *F. magna* byly ciliární papily také bilaterálně symetricky uspořádány okolo vyústění žláz, a to jednotlivě, dále pak i v podobě párové multiciliární papily. Pomocí SEM se počet cilií v multiciliární papile nepodařil určit, na průřezu papilou, který se podařil zachytit pomocí TEM, se nacházelo sedm cilií s uspořádáním mikrotubul $9 + 2$. Wilson (1970) u *F. hepatica* však popisuje, že uspořádání $9 + 2$ se nachází pouze v bazální části ciliárních receptorů, v terminální části pozoroval uspořádání ve formě sedmi vnějších párů se dvěma páry uprostřed.

V mezibuněčných valech se nacházejí tzv., laterální papily, jejichž vnější část je tvořena krátkou cilií zakončenou malým měchýřkem obsahujícím drobné vezikuly, celá vnější část je obklopena cytoplazmatickým výběžkem mezibuněčného valu. U laterálních papil *F. hepatica*, jejichž struktura je téměř shodná, však nebylo toto měchýřkovité zakončení popsáno (Wilson, 1970). U *F. hepatica* byl v blízkosti laterální papily popsán další typ vnitřního receptoru, který však při studiu miracidí *F. magna* nalezen nebyl. U obou druhů motolic byl dále na úrovni prvního mezibuněčného valu pozorován vnitřní párový receptor měchýřkovitého charakteru, v jehož stěnách byly pomocí bazálních tělísek ukotveny modifikované cilie s uspořádáním mikrotubul $9 + 0$. U *F. hepatica* těchto cilií bylo na řezech popsáno devět (Wilson, 1970), u *F. magna* jsme těchto cilií pozorovali maximálně osm. Těmto měchýřkovitým receptorům Wilson (1970) připisoval roli v georientaci. Ciliární receptory v přední části těla jsou zřejmě mechanoreceptory sloužící miracidium k orientaci v prostoru při vyhledávání a penetraci do plže, v průběhu penetrace byly pozorovány na povrchu miracida i po odvržení povrchových cilií (Kø ie et al., 1976).

Sporocysta

Transformace miracidia na sporocystu je poměrně složitý proces, během kterého dochází k mnoha výrazným morfologickým změnám. Erhardová-Kotrlá (1971) pozorovala ještě po 20 až 30 hodinách po penetraci na povrchu larvy epiteliální destičky, které se poté začaly uvol-

ňovat. V našem pozorování realizovaném na sporocystách zhruba 72 hodin po penetraci destičky přítomny již nebyly a povrch byl kryt členitým tegumentem. V přední části těla oválné sporocysty byly třetí den po infekci stále pozorovány zbytky apikální papily. U *F. hepatica* nebyla apikální papila pomocí SEM pozorována již 24 hodin po infekci plže (Kø ie et al., 1976). Pomocí TEM jsme pozorovali pozůstatky svaloviny apikální papily. V pozůstatcích apikální žlázy jsme podobně jako Coil (1981) našli několik granul, které zřejmě nebyly spotřebovány v průběhu penetrace. Sporocysta je na rozdíl od miracidia značně redukována. Byla pozorována redukce ganglionu i sensorických struktur, které nebyly nalezeny žádnou z námi použitých metod - SEM, TEM ani značením povrchových ciliárních receptorů protilátky proti alfa tubulinu. Ke stejnému výsledku získanému s využitím SEM dospěl dříve i Coil (1977). Ani na povrchu sporocyst *F. hepatica* nebyly sensorické struktury nalezeny (Southgate, 1970; Kø ie et al., 1976). Jedinou sensorickou strukturou, kterou se nám u sporocysty podařilo pozorovat, byla oční skvrna. Oční skvrna však také postupně zanikala, pozorovali jsme její rozpadání na jednotlivé pigmentové částice. Můžeme se tedy domnívat, že sensorické orgány mají významnou funkci při penetraci do plže, avšak k životu sporocyst v jeho tkáních již nejsou esenciální, a to zřejmě v důsledku poměrně pasivního způsobu života sporocyst. Sporocysty nevykazují výraznou pohybovou aktivitu a jejich účelem je hlavně produkce dalších larválních stádií. Vzhledem k absenci trávicí soustavy je výživa zřejmě zajišťována výrazně členitým tegumentem, který obsahuje četné mitochondrie a elektrondenzní granula. Tuto domněnku potvrzuje studie provedená Humiczewska (2002), ve které byla pomocí histochemických metod pozorována výrazná metabolická aktivita v tegumentu sporocyst *F. hepatica*, pravděpodobně související s výživou rychle proliferujících zárodečných buněk.

Redie

Redie jsou larvální stadia podlouhlého tvaru, u nichž se v přední části těla nalézá ústní otvor, za ním se nachází límcovitý tegumentální záhyb a v zadní části dva výběžky zvané procruscula (Erhardová-Kotrlá, 1971). Erhardová-Kotrlá (1971) udává, že procruscula jsou zploštělá, nicméně pomocí SEM jsme pozorovali, že jsou zakulaceného tvaru, v předešlé studii zřejmě došlo k jejich zploštění při zpracování vzorku. Naše pozorování s využitím SEM přibližně odpovídá popisu redií *F. hepatica* (Kø ie et al., 1977). V našem pozorování byla navíc pod límcem nalezena porodní papila, a dále několik typů sensorických struktur, které nebyly u *F. hepatica* dříve zmíněny. Redie je aktivní a pohyblivé stádium, zřejmě proto, na rozdíl od stadia sporocysty, se na jejich povrchu nacházejí četné sensorické struktury. Kø ie et al. (1977) v studii *F. hepatica* realizované s využitím SEM popisovala četný výskyt ciliárních papil okolo ústního otvoru, přičemž o jiných receptorech se nezmiňuje. Při našem pozorování byla použita kombinace SEM s fluorescenčním značením alfa tubulinu, kterým

lze značit, kromě dalších struktur (např. plaménkové buňky), právě receptory s ciliárním základem. V okolí ústního otvoru byly ve velkém množství nalezeny jednoduché ciliární receptory, které se nalézaly i dále po celém těle redie, ale již v menším množství. Pomocí SEM byly odlišeny kruhově uspořádány okolo přední části těla ciliární receptory s vysokou kopečkovitou bází. [Køie et al. \(1977\)](#) zmiňuje přítomnost struktur, které popisovala jako „knobs“. Je tedy možné že se jednalo o tyto receptory. V přední části těla, v blízkosti receptorů s kopečkovitou bází, byl s využitím TEM nalezen multiciliární typ papily, na průřezu byly pozorovány až tři cilie. U redií byly ve většině případů popisovány jen jednoduché ciliární receptory, multiciliární papily byly doposud popsány jen u redií několika druhů motolic, např. u *Echinostoma revolutum* ([Žďárská et al., 1988](#)). Variabilita v typech receptorů byla také pozorována u motolice *Notocotylus attenuatus* ([Czubaj a Niewiadomska, 1988](#)). Redie mají na rozdíl od stádia sporocysty dobře vyvinutou trávicí soustavu. Ve velkém vakovitém střevu byla pozorována trávenina, která střevní obsah zabarvuje do žluto-zelena. Epitel střeva je tvořen jednotlivými buňkami spojenými desmozomy. Na apikální straně epitelu je povrch zvětšen v podobě dlouhých tenkých mikrovilů, v cytoplazmě některých epiteliálních buněk byla pozorována kulatá elektrondenzní granula. Kromě absorpce živin, se střevní epitel zřejmě podílí i na trávení potravy, což bylo pomocí histochemických metod pozorováno u *F. hepatica* ([Moore a Halton, 1975](#)). U redií *F. hepatica* bylo před nervovým gangliem pozorováno velké množství žláz ústících do krátkého oesophagu ([Wilson, 1972](#)). V těchto žlázách se vyskytovala elektrondenzní granula neznámého charakteru, která se dukty přesouvala do syncytia oesophagu. [Wilson \(1972\)](#) se domníval, že granula obsahují hydrolytické enzymy a slouží tak k trávení přijaté potravy. Tento typ žláz jsme u redií *F. magna* ne našli. Pomocí H&E se však výrazně eosinofilně barvily buňky podlouhlého tvaru, které vedly okolo pharyngu k ústnímu otvoru, tyto buňky popsala ve své studii jako salivární i [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#), jejich funkce však nebyla objasněna. Výrazně eosinofilně H&E se barvil také tegument v přední části těla. V jednotlivých částech těla se lišil i charakter povrchu tegumentu, v přední části byly výběžky tegumentu spíše kratší a silnější, zatímco v zadní části těla byly spíše tenčí a delší. Dále bylo pomocí TEM zjištěno, že eosinofilně se barvící buňky jsou těla subtegumentálních buněk, které zásobují tegument v přední části malými kulatými elektrondenzními granuly. Tato granula se nacházela v tegumentu i dále po těle, ale ve výrazně menším množství. U *F. hepatica* bylo pomocí histochemických metod zjištěno, že kromě střeva je i tegument enzymaticky velmi aktivní a zřejmě se může podílet i na trávení a absorpci živin pocházející z tkání plže ([Moore a Halton, 1975](#)). Pozorovaná granula obsažená v tegumentu *F. hepatica* obsahovala hydrolytické enzymy a tito autoři předpokládali, že se podílejí na vnitrobuněčném trávení, přičemž nevyloučili ani možnost jejich vylučování vně tegumentu. Možnost extracelulárního trávení byla zmíněna i ve studii o *E. revolutum*, u které byly pozorovány tzv. frontální žlázy, které ústily také do tegumentu v blízkosti ústního otvoru stejně jako v případě *F. magna* ([Valkounová et al., 1989](#)).

Cerkárie

Cerkárie se vyvíjejí ze zárodečných buněk v zadní části těla redie. Z redie jsou do tkání plže uvolňovány porodním otvorem, který se nachází v přední části těla. Cerkárie má otrněné tělo s dvěma přísavkami a nevětvený ocáskem. Doposud bylo udáváno, že trny se na těle cercarií *F. magna* vyskytují pouze v jeho přední části, a to až do úrovně břišní přísavky (Swales, 1936; Erhardová-Kotrlá, 1971). Pomocí světelného mikroskopu jsme tyto husté řady trnů pozorovali v přední části těla právě až po úroveň acetabula. S využitím SEM byly nalezeny trny pouze na povrchu ústní přísavky, dále na těle se nacházely pravidelně uspořádané prohlubně. Vzhledem k tomu, že uspořádání těchto prohlubní odpovídalo rozmístění trnů pozorovanému světelnou mikroskopií, můžeme se domnívat, že u preparátů cercarií pro SEM se trny nacházely v těchto prohlubních a nevyčnívaly na povrch, prohlubně na povrchu cercarií byly pozorovány pomocí SEM také u *F. hepatica* (Køie et al., 1977). Pomocí TEM bylo nově zjištěno, že trny se vyskytují i v zadní části těla cercarie *F. magna* a dokonce i v tegumentu na bázi ocásku. Otrnění ocásku však nebylo pozorováno pomocí SEM, a to ani u *F. hepatica*. Přítomnost trnů v zadní části těla cercarie mohla uniknout pozornosti mnohých autorů zřejmě díky velkému množství cystogenních granul, které se v tegumentu nacházejí. Po jejich vyprázdnění při tvorbě metacercariálních obalů jsou však trny již dobře zřetelné po celém těle encystované metacercarie. Četné otrnění bylo pomocí SEM popisováno také u excystovaných metacercarií obou druhů motolic (Køie et al., 1977; Fried et al., 1986).

Cerkárie, po opuštění redie, ještě několik dní setrvávají v hepatopankreatu plže, než dojde k jejich uvolnění do vnějšího prostředí (Swales, 1935). Během této fáze ve tkáních plže nebylo pozorováno, že by cercárie, i přestože již mají vytvořeny základy trávicí soustavy, aktivně přijímaly potravu. Jednotlivé buňky střevního epitelu byly spojeny desmozomy a v jejich cytoplazmě se nacházela velká elektrondenzní granula. Apikální část střevního epitelu ale neměla zvětšený povrch vhodný k absorpci živin. Lumen střeva byl vyplněn zvláštním materiálem homogenního charakteru a neznámého složení. Swales (1936) ve své práci popisuje změny v morfologii cercarie, které se odehrávají během setrvávání ve tkáních plže. Dochází ke zvětšení délky ocásku cercarie a také ke změně v rozmístění produktů cystogenních žlázových buněk, které byly nejprve uspořádány do tvaru připomínajícího podkovu, poté se však dochází k jejich rozprostření po celém povrchu cercarie. Pomocí histologického barvení a TEM jsme u cercarií pozorovali čtyři typy cystogenních žlázových buněk, které jsme popsali jako buňky typu I, II, III a IV. Tyto cystogenní žlázové buňky lze od sebe odlišit na základě jejich umístění a sekrečního obsahu. Stejný počet typů cystogenních žlázových buněk byl pozorován i u cercarií *F. hepatica* (Dixon, 1966). Všechny typy cystogenních buněk se začínají tvořit již během intrarediálního stádia vývoje cercarie. Na ventrální straně cercarie se nacházejí žlázy typu I, které obsahují opalescentní granula proteinového charakteru, pomocí TEM bylo pozorováno, že granula mají žíhanou strukturu. (Campbell, 1960a)

v těchto granulech pomocí histochemických testů u *F. magna* prokázal přítomnost enzymu fenolázy. U *F. hepatica* měla granula stejnou ultrastrukturu, přítomnost fenolázy však prokázána nebyla (Dixon, 1966; Dixon a Mercer, 1967). Cystogenní žlázy typu II se nacházejí podélných řadách na dorzální straně cercárie a na ventrální okolo břišní přísavky, ve své cytoplazmě obsahují dle histochemického barvení kyselé mukopolysacharidy. Na ventrální straně se mezi břišní přísavkou a pharyngem nacházejí cystogenní žlázy typu III, které obsahují velké množství kulatých granul mukoproteinového charakteru. Žlázové buňky typu IV se vyskytují na dorzální straně a obsahují shluky podlouhlých tyčkovitých granul. Tyto granula ve své studii pozoroval již Campbell (1960a), podrobněji však charakterizována nebyla. Pomocí TEM bylo pozorováno, že jsou tvořeny svinutými lamelami, zřejmě proteinového charakteru. Dixon (1966) ve své studii udává, že tento protein je stabilizovaný disulfidickými vazbami a nazval tento typ žlázových buněk jako keratinové buňky.

Ještě během intra-rediální fáze vývoje dochází k přesunu produktů žláz typu III do tegumentu cercárie, kde utvoří slabou vrstvičku. Poté, co cercárie opustí redii, dochází k přesunu velkého množství opalescentních granul, z ventrálně lokalizovaných žláz typu I, do téměř celého tegumentu, s výjimkou obou přísavek a místa napojení ocásku (Swales, 1935; Campbell, 1960a). Dixon (1966) se zde ve svém pozorování u *F. hepatica* rozchází s našimi výsledky, neboť přesun cystogenních granul typu I do tegumentu cercárií pozoroval ještě v průběhu vývoje v redii. Při našem pozorování však nebyla nikdy cercárie uvnitř redie s těmito granuly v tegumentu pozorována. Přesun produktů zbylých dvou typů cystogenních žláz (III a IV) do tegumentu pozorován nebyl, k jejich využití dochází zřejmě až během procesu encystace. Distribuce jednotlivých typů granul v tegumentu se u těchto „zralých“ cercárií liší na jejich ventrální a dorzální straně. Na dorzální straně se těsně pod povrchem vyskytuje uspořádaná vrstva cystogenních granul typu II, zatímco na ventrální straně toto rozvrstvení pozorováno nebylo. Námi pozorovaný rozdíl v distribuci cystogenních granul v rámci jednotlivých částí tegumentu u *F. hepatica* není uváděn (Dixon a Mercer, 1967). Přesun cystogenního materiálu do tegumentu zřejmě umožňuje ve vnějším prostředí rychlou tvorbu obalů z předpřipraveného materiálu. Tento proces „dozrávání“ může být také jednou z příčin setrvání cercárií ve tkáních plžů. Vzhledem k tomu, že při pitvách plžů se některé z uvolněných cercárií nebyly schopny encystovat, mohlo se jednat o cercárie těsně po vyloučení z redie, které nebyly na encystaci ještě připraveny.

Po opuštění plže se cercárie pohybují ve vodním prostředí pomocí dlouhého ocásku a vyhledávají místo k encystaci (Swales, 1935). Tvar jejich ocásku je kulovitého průřezu, ač u některých z našich vzorků jsme po jeho stranách pozorovali „lemy“. Tyto postranní lemy byly zaznamenány také při studiu SEM cercárií *F. hepatica* (Bennett, 1975; Kõie et al., 1977). Autoři těchto prací se domnívali, že lemy umožňují cercárii lépe se pohybovat ve vodním prostředí. Z našich pozorování však vyplývá, že se zřejmě jedná o artefakt vzniklý při

zpracování materiálu, při kterém došlo ke smrštění povrchu ocásku, a pozorované lemy jsou pravděpodobně tvořeny mohutnou podélnou svalovinou.

K orientaci cercárii ve vnějším prostředí slouží velký počet povrchových senzorických receptorů. Žádná z předešlých studií týkajících se *F. magna* senzorické struktury u cercárie nepopisuje. Při našich pozorováních bylo nalezeno velké množství senzorických papil ciliárního charakteru, zejména v přední části těla, hlavně okolo ústní přísavky. Na ústní přísavce byly pomocí SEM pozorovány i aciliární senzorické papily a v její blízkosti byla také nalezena multiciliární papila. S výjimkou multiciliární papily se naše pozorování shoduje s popisem senzorických papil na těle cercárie *F. hepatica*, a to i včetně jejich popisu na ultrastrukturální úrovni (Dixon a Mercer, 1965; Køie et al., 1977). Výskyt multiciliárních papil u cercárií není neobvyklý a byl v daleko větším množství zaznamenán například u *Echinostoma revolutum* (Fried a Fujino, 1987). Velké množství senzorických papil jsme našli také na ocásku. Na jeho ventrální straně se nachází ve dvou řadách 17 pravidelně uspořádaných párů ciliárních papil. Další skupina papil se vyskytovala laterálně po obou stranách ocásku. Na ocásku cercárií *F. hepatica* byly pozorovány pouze papily na jeho ventrální straně, a to v počtu 16 párů (Bennett, 1975; Køie et al., 1977). Výskyt laterálně lokalizovaných papil v literatuře již zmíněn není. Vzhledem k tomu, že přítomnost těchto laterálně umístěných papil se v našem pozorování podařilo odhalit až dodatečně za použití fluorescenčního značení tubulinu (pomocí SEM nebyly nejprve odhaleny), je možné, že ve studiích provedených pouze za pomoci SEM tyto papily unikly pozornosti vědců.

Metacercárie

Cercárie ve vnějším prostředí rychle přisedá na pevný podklad a započíná komplexní proces encystace, během kterého okolo sebe vytvoří obaly, které ji chrání jak před vlivy vnějšího prostředí, tak i při pasáži zaživacím traktem definitivního hostitele (Erhardová-Kotrlá, 1971).

Pomocí histologického barvení byly odlišeny celkem čtyři vrstvy ochranných obalů metacercárie, zatímco pomocí SEM pouze tři a pomocí TEM jen dva. U metacercárie *F. hepatica* byly pomocí histologického barvení a TEM odlišeny čtyři hlavní vrstvy, u kterých byly rozlišeny další subvrstvy (Dixon a Mercer, 1964; Dixon, 1965).

Na vnějším povrchu metacercárie *F. magna* jsme pomocí histologického barvení pozorovali tenkou vrstvu materiálu tvořenou mukopolysacharidy. Vzhledem k uspořádání cystogenních granul v tegumentu cercárie, by tato vrstva mohla být tvořena materiálem granul typu III. Tato granula se nacházejí v uspořádané vrstvě pod vnější membránou tegumentu na dorzální straně těla cercárie. Tuto vrstvu metacercariálního obalu se však nepodařilo žádnou jinou metodou charakterizovat. U metacercárie *F. hepatica* nebyla tato vrstva vůbec popsána (Dixon a Mercer, 1964; Dixon, 1965).

Jednou z variant, proč se vnější povrch metacerkárií takto barvil, je i možnost, že během skladování metacerkárií v odstáté vodě po delší dobu mohlo dojít ke vzniku bakteriálních nebo houbových plaků na jejich vnějším povrchu. Asociace bakterií s metacerkariálními obaly byla četně dokumentována pomocí různých metod, byl také pozorován negativní vliv těchto organismů na viabilitu metacerkárií (Bennett, 1975; Køie *et al.*, 1977; Keeler *et al.*, 2007). Další z obalů je tvořen materiálem houbovitého charakteru, který lze snadno mechanicky oddělit od ostatních obalů, u metacerkárie *F. hepatica* má tento obal shodnou strukturu, je však definován jako vnější vrstva (Køie *et al.*, 1977). Tento obal je tvořen za pomoci granul cystogenních žláz typu I, ze kterých se uvolňuje materiál tvořící houbovitou vrstvu. V některých případech byla tato granula nalezena na povrchu metacerkárií celá a nerozvolněná, kdy zřejmě došlo k jejich fixaci ještě během procesu encystace. Tato cystogenní granula obsahují enzym fenolázu (Campbell, 1960a), za pomoci které společně se změnou zabarvení dochází i k vytvrzení („tanning“) nově vzniklého obalu, a tudíž tento obal zřejmě slouží jako odolná mechanická ochranná vrstva metacerkárie. U *F. hepatica* je tato vrstva v literatuře nazývána jako „tanned layer“ (Dixon, 1965). Mezi tímto a kompaktním vnitřním obalem byla pozorována tenká vrstva tvořená mukopolysacharidy. U metacerkárie *F. hepatica* v tomto místě autoři pomocí SEM odlišili dvě tenké vrstvy (Køie *et al.*, 1977). Pomocí TEM byly u těchto dvou vrstev rozlišeny další podvrstvy tvořené různým materiálem (Dixon a Mercer, 1964). Vnitřní vrstva je tvořena koncentricky uspořádanými lamelami proteinového charakteru, které vznikají rozvinutím tyčinkovitých útvarů z cystogenních žláz typu III. Na ventrální straně tohoto obalu se nachází oblast s odlišnou barvitelností. Tuto část vnitřního obalu se nám však pomocí TEM nepodařilo lépe charakterizovat. Dixon a Mercer (1964) popisují, že jednotlivé vrstvy lamel vnitřní vrstvy obalu metacerkárie *F. hepatica* jsou stabilizovány disulfidickými vazbami, ventrální oblast (nazývanou ventrální zátka) pomocí TEM také dále nepopisují. Vnitřní vrstva je velmi odolná vůči vnějším vlivům a také skrz ni neproniká fixace, ve které metacerkárie zůstávala naživu i po několik hodin. Vnitřní struktury proto nebyly zachovány v uspokojivé kvalitě.

Z obalů se metacerkárie uvolňuje procesem excystace v zažívacím traktu hostitele (Fried *et al.*, 1986). K excystaci dochází za produkce enzymů, které rozruší metacerkariální obaly v místě ventrální zátky. U *F. hepatica* se autoři domnívali, že enzymatické produkty potřebné k excystaci a penetraci tkáněmi hostitele se nacházejí ve střevě juvenilního jedince (Bennett a Threadgold, 1973). Střevní epitel juvenila při pozorování TEM vykazoval spíše než absorpční charakter sekreční, v lumen jeho střeva se nacházel homogenní materiál. Tvorbu podobného homogenního materiálu jsme pomocí TEM pozorovali již u stádia cerkárie. U metacerkárie se nám obsah střeva vzhledem k poškozené ultrastruktuře nepodařilo prostudovat.

Dospělec

Makroskopický popis dospělců je uveden v mnoha publikacích zabývajících se patologií definitivních hostitelů (Erhardová-Kotrlá, 1971; Novobilský *et al.*, 2007b). Dospělci *F. magna* jsou charakterističtí svými velkými rozměry a oválným tvarem těla, které je zabarveno do červeno hněda. Tvar těla i jeho velikost jsou dle našich pozorování poměrně variabilní, průměrná naměřená délka byla 3,9 cm a šířka 2,5 cm, což je méně než rozměry publikované ve starších studiích, kdy naměřená délka byla 4,1 – 8,6 cm a šířka 21 – 31 cm (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971). Tato odchylka by mohla být způsobena malým počtem červů v našem měření (cca 30 jedinců). Tyto zmíněné charakteristiky *F. magna* jasně odlišují od dospělého *F. hepatica*, která má tělo světlé barvy a menších rozměrů (do 3 cm), v jeho přední části těla se nalézá výrazný konus s přísavkou (Thomas, 1883; Pybus, 2001; Jones *et al.*, 2005).

Pomocí SEM byl studován povrch dospělého *F. magna* a bylo zjištěno, že je pokryt četnými trny, jejichž tvar i počty se v různých částech těla liší. V přední části jsou trny četnější a mají pilovitý tvar, v zadní části těla se nachází menší počet trnů jednoduchého tvaru. V této části pozorování se naše výsledky shodují s již provedenými studiemi (Qureshi *et al.*, 1989; Naem *et al.*, 2012). Ve studii (SEM) dospělců získaných z jater býků (Naem *et al.*, 2012), je popisován pár podlouhlých výběžků uvnitř břišní přísavky, které však při našem pozorování nalezeny nebyly. Také tvar samotné břišní přísavky, který tato autorka popisuje jako neohraňovaný, se neshoduje s našimi pozorováními, ve kterých měla břišní přísavka jasně definovaný okraj. Pomocí TEM byla studována i ultrastruktura povrchového tegumentu, ve kterém byly nalezeny četné mitochondrie a dva typy vezikul. Ve velkém množství byly pozorovány vezikuly, které byly charakteristické svým bikonkávním tvarem a odpovídaly popisu vezikul pojmenovaných T2 v tegumentu *F. hepatica* (Threadgold, 1967). Druhý pozorovaný typ vezikul, který byl v tegumentu v menším množství, svým charakterem, spíše než druhému popsanému typu (T1), odpovídal vezikulům pozorovaným u juvenilních jedinců *F. hepatica* (Bennett a Threadgold, 1973). Velkou část těla dospělého vyplňovalo střevo, které bylo tvořeno epiteliálními buňkami, jejichž apikální část vybíhala do lumen v podobě dlouhých tenkých výběžků. Vzhledem k velikosti dospělého se nám pomocí TEM na získaných řezech nepodařilo prozkoumat více úseků střeva. U *F. hepatica* je udáváno, že střevní epitel je tvořen sice jedním typem buněk, nicméně podle jejich funkce je lze rozlišit do 3 funkčních subtypů dle toho, zda u nich převažuje funkce absorpční nebo sekreční (Robinson a Threadgold, 1975).

Další výrazný diferenční znak odlišující obě motolice se nachází ve stavbě pohlavní soustavy, která byla studována na histologických preparátech. U obou motolic se nacházejí vitelária od úrovně acetabula dále do zadní části těla (Erhardová-Kotrlá, 1971; Jones *et al.*, 2005). Vitelária *F. magna* jsme na histologických řezech pozorovali ve ventrální části těla, ventrálně od větveného střeva. V některých okrajových částech těla, zejména v jeho zadní části, však byly pozorovány i dorzálně. Stejně rozložení vitelárií *F. magna* je popisováno i

v práci [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#), která ve své studii zároveň studovala i rozmístění vitelárií u *F. hepatica*. Vitelária u *F. hepatica* se narodí od *F. magna* nalézala jak na ventrální, tak i dorzální straně těla červa. Dále se tyto motolice liší v uspořádání párových varlat, u *F. magna* se nacházejí blízko sebe a jedno z nich leží mírně nad druhým, zatímco u *F. hepatica* jsou uloženy uprostřed těla za sebou ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#); [Jones et al., 2005](#)).

6.2 Patogenní působení *F. magna*

Přirozeně infikovaní hostitelé

Během naší studie se podařilo získat játra z těchto druhů přirozeně infikovaných hostitelů: jelena lesního (*Cervus elaphus*), jelena siky (*Cervus nippon*), daňka obecného (*Dama dama*) a tura domácího (*Bos primigenius* f. *taurus*). Játra získaná z nakaženého skotu byla v obou případech silně koinfikovaná motolicí *F. hepatica*. Na území České republiky se v tomto případě jedná o unikátní nález, vzhledem k tomu, že poslední případ přirozené nákazy skotu *F. magna* byl na našem území zaznamenán zhruba před 30 lety ([Chroustová, 1980](#)). O společných nákazách skotu se také v literatuře vyskytují zmínky a bylo pozorováno, že oba dva druhy motolic během infekce dosáhly pohlavní dospělosti ([Foreyt a Todd, 1972](#)).

Získaná játra se lišila v intenzitě nákazy (i v rámci jednoho druhu), která byla často vyšší u starších kusů. Napadená játra byla zvětšená, okraje jejich laloků zaoblené, na povrchu byly znatelné stopy charakteristického pigmentu a v některých případech se na povrchu vyskytovaly i fibrinózní výběžky. Motolice byly často nalézány volně v jaterní tkáni, kterou svou migrací výrazně poškozovaly, v parenchymu se nacházely rozsáhlé hemoragie, způsobované zejména juvenilními, ale i stále migrujícími dospělými jedinci motolic. [Foreyt a Todd \(1976\)](#) pozorovali migraci jedinců velkých i několik centimetrů, a to více jak po půl roce od infekce definitivního hostitele (jelenec běloocasý). Autoři této studie se domnívali, že retardace ve vývoji může být způsobena kompeticí motolic, odolností hostitele nebo jinými, neznámými faktory. Dospělce *F. magna* jsme při našich pozorováních však nejčastěji nalézali u jelenovitých po dvojicích nebo i trojicích enkapsulované v charakteristických fibrózních pseudocystách, které často tvořily vybouleniny na povrchu jater. Námi pozorované makroskopické změny jater se shodují s velkým množstvím publikovaných údajů jiných autorů ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#); [Novobilský et al., 2007b](#); [Marinković et al., 2013](#)). Jaterní tkáň býků (NDH), ve které bylo nalezeno velké množství *F. hepatica*, kromě patologických změn způsobených *F. magna*, vykazovala i změny typické pro fasciolózu v podobě zánětlivě zesílených a kalcifikovaných stěn žlučových (Pybus, 2001). Během naší experimentální práce jsme se zaměřili na pozorování struktury jaterních pseudocyst, ve kterých se nalézaly enkapsulované motolice. Pseudocysty jsou tvořeny vrstvami vazivové tkáně a jejich povrch na vnitřní

straně je často velmi zvrásněný. [Swales \(1935\)](#) ve své studii popisuje, že pseudocysty u jelenovitých jsou napojeny na systém žlučovýchodů a označil je jako „otevřené pseudocysty“, zatímco pseudocysty skotu jako „uzavřené“, jelikož napojení zcela chybí nebo je zablokované. [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#) při makroskopickém ohledání stěn pseudocyst tato napojení na žlučový systém nenalezla a ani nám se přítomnost těchto napojení nepodařilo makroskopicky spolehlivě prokázat.

Z velkého množství publikací, zabývajících se patologií *F. magna* na histologické úrovni, popisuje napojení pseudocyst na systém žlučovýchodů a kapilár právě [Swales \(1935\)](#), který uvádí, že volně uspořádaným vazivem tvořícím stěnu pseudocysty penetrují malé žlučové vodů, které byly vznikem pseudocysty dočasně přerušeny. Tento způsob vzniku napojení žlučovýchodů na pseudocystu potvrzují i naše pozorování, motolice často migrovaly podél žlučových kanálků, kde posléze docházelo k jejich enkapsulaci. Mezi plně formovanými pseudocystami získanými z jednotlivých typů hostitelů nebyly pozorovány zásadní rozdíly. V případě vzorků z jater býků (NDH), byly však již pohlavně dospělé motolice získány v okamžiku, než došlo k jejich enkapsulaci vazivem v takové míře, aby je bylo možné považovat za pseudocysty a porovnávat s ostatními hostiteli.

V několika publikacích se také objevují zmínky o pseudocystách, které vznikly granulomatózní přeměnou žlučovýchodů po penetraci motolice, přičemž o jejich původu svědčí pouze zbytky žlučového epitelu uvnitř těchto pseudocyst ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#); [Marinković et al., 2013](#)). Žlučový epitel na vnitřní části pseudocyst jsme však u našich vzorků nepozorovali, částečně i proto, že na vnitřní straně pseudocyst se často nacházejí v pojivové tkáni zarostlá vajíčka, která někdy kryjí velkou část vnitřního povrchu. Ve stěnách pseudocyst SDH byly nalézány jednotlivé průřezy žlučovým kanálky nebo u starších pseudocyst pouze pozůstatky atrofovaného epitelu. V některých místech, zejména na okrajích pseudocyst přilehlých k parenchymu, docházelo k výrazné proliferaci žlučovýchodů. V lumen žádného ze žlučovýchodů jsme však vajíčka nepozorovali. Ačkoliv se nám pomocí histologických metod nepodařilo jednoznačně nalézt u pseudocyst místo vstupu vajíček do žlučového systému, o tomto způsobu jejich uvolňování svědčí četné publikované nálezy vajíček přítomných ve žlučovodech a následně i v trusu zvěře ([Swales, 1935](#); [Kingscote, 1950](#); [Erhardová-Kotrlá, 1971](#)).

V několika případech byly ve žlučovém epitelu u býků pozorovány tzv. globulární leukocyty, v jejichž cytoplazmě se nacházela velká eosinofilní granula. U jelenovitých jsme tyto leukocyty nepozorovali, ve své studii je u této skupiny však zmiňuje [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#), dále byl jejich výskyt popsán i u napadených ovcí ([Foreyt a Parish, 1990](#)). Původ a přesná funkce těchto buněk nebyla doposud plně objasněna, ale jejich přítomnost je častá právě při parazitárních onemocněních ([Nikander, 1991](#); [Spoor et al., 2011](#)).

V několika případech byla vajíčka nalezena v cévním systému jelenů i býků. Podobné

nálezů popisuje je i [Erhardová-Kotrlá \(1971\)](#). Do cévního systému se vajíčka zřejmě mohou dostat z migrací poškozené tkáně nebo pomocí zánětlivých změn. V jedné studii byla dokonce pozorována migrace *F. magna* přímo cévním systémem ([Foreyt a Todd, 1972](#)).

Experimentální nákaza

Z podaných 25 metacerkárií byly z potkanů získány v prvním případě (58 dpi) dva a v druhém (92 dpi) jeden kus motolice, což odpovídá 4 a 8% úspěšnosti nákazy. Tato hodnota je nižší než například v experimentu s morčaty, kde byla pozorována úspěšnost 7,7 – 17,9% ([Conboy a Stromberg, 1991](#)). Ani jeden z potkanů nevykazoval znatelné známky nákazy a ani nákaze v průběhu experimentu nepodlehli. V experimentech s morčaty, popisovaných v práci [Conboy a Stromberg \(1991\)](#), byla použita nižší infekční dávka metacerkárií (20 ks), k úhynům však docházelo již od sedmého dne po infekci. Motolice byly při pitvě potkanů z našeho experimentu nalezeny v serózách tlustého a tenkého střeva potkana a volně v horní části břišní dutiny. O migraci břišní dutinou svědčila přítomnost charakteristického pigmentu ([Campbell, 1960b](#); [Pybus, 2001](#)). Pozorovaná hepatitida u jednoho z potkanů zřejmě souvisela s probíhajícím zánětem v břišní dutině způsobeným migrací motolice. Zatímco u SDH juvenilní motolice dosahují jater již za dva týdny po infekci ([Presidente et al., 1974](#)), u potkanů přítomnost červů v jaterní tkáni nebyla histologicky potvrzena ani po třech měsících od nákazy. Z těchto výsledků můžeme usoudit, že potkany lze zařadit do kategorie takzvaných netypických (aberrantních) hostitelů ([Pybus, 2001](#); [Siegelová et al., 2012](#)). Ze zjištěné pohlavní nedospělosti motolic nelze vyvozovat jednoznačné závěry, a to vzhledem k faktu, že potkani byli usmrceni v době na spodní hranici uváděného času potřebného pro dosažení pohlavní dospělosti, která je normálně v rozmezí 3 -7 měsíců ([Erhardová-Kotrlá, 1971](#)).

7 Závěr

Tato práce se zabývá morfologickou redeskripcí vývojových stádií motolice *F. magna* a sledováním patogenního působení této motolice v jaterní tkáni vybraných typů definitivních hostitelů.

Dosažené výsledky

Morfologická redeskripce vývojových stádií *F. magna*

1. Poprvé byly pomocí SEM uceleně popsány povrchové charakteristické znaky všech životních stádií motolice *F. magna*. Bylo zjištěno, že v literatuře diskutovaný výběžek vajíčka je tvořen výběžkem vaječné stěny. V kombinaci s fluorescenčním značením protilátek proti alfa tubulinu byly lokalizovány a popsány pro fascioloidní motolice dosud neznámé povrchové senzorické papily.
2. Poznatky z histologického pozorování vnitřních struktur jednotlivých stádií ze starších studií byly revidovány a rozšířeny o pozorování pomocí TEM. Pozorován byl nový typ penetračních žláz miracidia a celkem čtyři typy cystogenních žláz cercárie, které se podílejí na tvorbě čtyř obalů metacercárie.
3. Porovnání našich výsledků s literaturou týkající se *F. hepatica* naznačuje výraznou podobnost larválních stádií, nalezeny byly však i významné rozdíly např. v distribuci senzorických papil.

Patogenní působení *F. magna*

4. Makroskopicky nebylo spolehlivě prokázáno napojení pseudocyst na systém žlučových ani u jednoho typu z hostitelů. Na histologických řezech stěnami pseudocyst však bylo pozorováno jejich cévní zásobením i přítomnost žlučových kanálků, přítomnost vajíček však byla pozorována pouze v lumen cév.
5. U jelenovité zvěře i skotu byla v jaterní tkáni pozorována migrace sexuálně dospělých motolic, které produkovaly vajíčka.
6. U dvou kusů skotu z jihočeské biofarmy byla v játrech prokázána koinfekce motolicemi *F. magna* a *F. hepatica*.

7. Průběh experimentální infekce potkanů naznačuje, že vzhledem k absenci enkapsulace červů, kteří trvale migrovali v tělní dutině, je lze zařadit do kategorie netypických hostitelů.

Publikace vzniklé v průběhu vypracovávání této práce

Kašný M, Beran L, Siegelová V, Siegel T, Leontovyč R, Beránková K, Pankrác J, Košťáková M, Horák P. 2012. Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. *Veterinární Medicína* 57: 101–109.

Leontovyč R, Košťáková M, Siegelová V, Melounová K, Vrbová K, Pankrác J, Horák P, Kašný M. Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *Veterinary Research* (Zasláno do redakce).

Siegelová V, Pankrác J, Košťáková M, Melounová K, Siegel T, Leontovyč R, Kašný M. 2012. Nález motolice obrovské (*Fascioloides magna*) u skotu a zhodnocení rizik fascioloidózy v České republice. *Veterinářství* 7: 440 – 443.

Použitá literatura

- Abrous, M, Comes, A M, Gasnier, N, Rondelaud, D, Dreyfuss, G, Chauvin, A, Ménard, A, Agoulon, A, a Cabaret, J. Morphological variability in *Fasciola hepatica* eggs in ruminants, rodents and lagomorphs. *Journal of helminthology*, 72(4):313–7, Dec. 1998.
- Bennett, C.E. Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* L. *The Journal of Parasitology*, 61(5):886–891, 1975.
- Bennett, C.E. a Threadgold, L T. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. XIII. Fine structure of newly excysted juvenile. *Experimental Parasitology*, 34(1):85–99, Aug. 1973.
- Campbell, W C. Presence of phenolase in the fasciolid metacercarial cyst. *The Journal of Parasitology*, 46(6):25–26, 1960a.
- Campbell, W C. Nature and possible significance of the pigment in fascioloidiasis. *The Journal of Parasitology*, 46(6):769–775, 1960b.
- Campbell, W C. Notes on the Egg and Miracidium of *Fascioloides magna*, (Trematoda). *Transactions of the American Microscopical Society*, 80(3):308–319, 1961.
- Campbell, W C a Todd, A C. Natural infections of *Fascioloides magna* in Wisconsin sheep. *The Journal of Parasitology*, 40(1):100, 1954.
- Campbell, W C a Todd, A C. Behavior of the Miracidium of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917 in the Presence of a Snail Host. *Transactions of the American Microscopical Society*, 74(4):342–347, 1955a.
- Campbell, W C a Todd, A C. In vitro metamorphosis of the miracidium of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917. *Transactions of the American Microscopical Society*, 74(3):225–228, 1955b.
- Campbell, W C a Todd, A C. Emission of cercariae and metacercariae in snail feces. *Transactions of the American Microscopical Society*, 75(2):241–243, 1956.
- Chroustová, E. Prevence a terapie fascioloidózy skotu bithionolsulfoxidem. *Veterinární medicína*, 25:557–563, 1980.
- Coil, W H. The penetration of *Fascioloides magna* miracidia into the snail host *Fossaria bulimoides*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 52(1):53–59, 1977.

- Coil, W H. Miracidial penetration in *Fascioloides magna* (Trematoda). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 52(1):299–307, 1981.
- Conboy, G A a Stromberg, B E. Hematology and clinical pathology of experimental *Fascioloides magna* infection in cattle and guinea pigs. *Veterinary parasitology*, 40(3-4):241–55, Nov. 1991.
- Conboy, G A, O'Brien, T D, a Stevens, D L. A natural infection of *Fascioloides magna* in a llama (*Lama glama*). *The Journal of parasitology*, 74(2):345–6, Apr. 1988.
- Czubaj, A. a Niewiadomska, K. Types of sensory cells in *Notocotylus attenuates* (Rud., 1809) rediae (Digenea, Notocotylidae). *Parasitology Research*, 74(3):243–249, 1988.
- Dixon, K E. The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*, 55:215–26, May 1965.
- Dixon, K E. A morphological and histochemical study of the cystogenic cells of the cercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*, 56(2):287–97, May 1966.
- Dixon, K E a Mercer, E H. The fine structure of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 3(72):385–389, 1964.
- Dixon, K E a Mercer, E H. The fine structure of the nervous system of the cercaria of the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. *The Journal of parasitology*, 51(6):967–976, 1965.
- Dixon, K E a Mercer, E H. The formation of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Vienna Austria* 1948, 77(3):345–360, 1967.
- Erhardová-Kotrlá, B. *The occurrence of Fascioloides magna (Bassi, 1875) in Czechoslovakia*. Academia Prague, 1971.
- Faltýnková, Anna, Horáčková, Eva, Hirtová, Lenka, Novobilský, Adam, Modrý, David, a Scholz, T. Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica*, 51(2):87–90, June 2006.
- Foreyt, W J. Experimental *Fascioloides magna* infections of mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 28(2):183–187, 1992.
- Foreyt, W J. Mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus*) as experimental definitive hosts for *Fascioloides magna*. *Journal of wildlife diseases*, 32(4):603–6, Oct. 1996.

- Foreyt, W J a Foreyt, K M. Albendazole treatment of experimentally induced *Fascioloides magna* infection in goats. *Veterinary medicine small animal clinician VM SAC*, 75(9): 1441–1444, 1980.
- Foreyt, W J a Parish, Steven. Experimental infection of liver flukes (*Fascioloides magna*) in a llama (*Lama glama*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 21(4):468–470, 1990.
- Foreyt, W J a Todd, A C. The occurrence of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* together in the livers of naturally infected cattle in south Texas, and the incidence of the flukes in cattle, white-tailed deer, and feral hogs. *The Journal of parasitology*, 58(5): 1010–1, Oct. 1972.
- Foreyt, W J a Todd, A C. Efficacy of rafoxanide and oxyclozanide against *Fascioloides magna* in naturally infected cattle. *American journal of veterinary research*, 35(3):375–7, Mar. 1974.
- Foreyt, W J a Todd, A C. Parenteral infection of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with metacercariae of *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna*. *The Journal of Parasitology*, 62(1):144–5, Feb. 1976.
- Foreyt, W J a Todd, A C. Selected clinicopathologic changes associated with experimentally induced *Fascioloides magna* infection in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases*, 15(0114):83–89, 1979.
- Foreyt, W J, Samuel, W M, a Todd, A C. *Fascioloides magna* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): Observations on the pairing tendency. *The Journal of Parasitology*, 63(6): 1050–1052, 1977.
- Fried, B a Fujino, T. Argentophilic and scanning electron microscopic observations of the tegumentary papillae of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) cercariae. *Journal of Parasitology*, 73(6):1169–1174, 1987.
- Fried, B a Stromberg, B E. In vitro excystment of metacercariae of *Fascioloides magna* (Trematoda). *The Journal of parasitology*, 71(2):263, 1985.
- Fried, B, Vates, T S, Wisnewski, N, a Stromberg, B E. Scanning electron microscopy and chemical excystation of *Fascioloides magna* (Trematoda) metacercariae. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72(5):631–4, Jan. 1986.
- Friedl, F.E. Friedl, F.E., 1961. Studies on larval *Fascioloides magna*. I. Observations on the survival of rediae in vitro. . *The Journal of Parasitology*, 47(1):71–75, 1961.

- Galaktionov, K. a Dobrovolskij, A. *The Biology and Evolution of Trematodes: An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmissions, and Evolution of Digenetic Trematodes*. Springer, 2003. ISBN 1402016344.
- Griffiths, H J a Christensen, C A. Survival of metacercariae of *Fascioloides magna* in water at room temperature and under refrigeration. *The Journal of parasitology*, 58(2):404–5, Apr. 1972a.
- Griffiths, H J a Christensen, C A. Further observations on the survival of metacercariae of *Fascioloides magna* in water at room temperature and under refrigeration. *The Journal of parasitology*, 58(2):335, Apr. 1972b.
- Heneberg, Petr. Phylogenetic data suggest the reclassification of *Fasciola jacksoni* (Digenea: Fasciolidae) as *Fascioloides jacksoni* comb. nov. *Parasitology research*, 112(4):1679–89, Apr. 2013.
- Humiczewska, Mirosława. Some specific and non-specific phosphatases of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. II. Enzymes associated with the membrane transport. *Folia parasitologica*, 49(3):221–6, Jan. 2002.
- Hussein, ANA, Hassan, Ismael M., a Khalifa, Refaat M.a. Development and hatching mechanism of *Fasciola* eggs, light and scanning electron microscopic studies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(3):247–251, July 2010.
- Huňová, Kateřina, Kašný, Martin, Hampl, Vladimír, Leontovyč, Roman, Kuběna, Aleš, Mikeš, Libor, a Horák, Petr. Radix spp.: Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic. *Acta parasitologica / Witold Stefański Institute of Parasitology, Warszawa, Poland*, 57(3):273–84, Sept. 2012.
- Irwin, S W a Threadgold, L T. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. X. Egg formation. *Experimental Parasitology*, 31(3):321–31, June 1972.
- Jones, A., Bray, R. A., a Gibson, D. I. *Keys to the Trematoda: Volume 2*. CABI Publishing, 2005. ISBN 0-85199-587-X.
- Jones, Malcolm K, Bong, Sze How, Green, Kathryn M, Holmes, Philadelphia, Duke, Mary, Loukas, Alex, a McManus, Donald P. Correlative and dynamic imaging of the hatching biology of *Schistosoma japonicum* from eggs prepared by high pressure freezing. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(11):e334, Jan. 2008.
- Kašný, Martin, Beran, L., Siegelová, V., Siegel, T., Leontovyč, Roman, Beránková, K., Pankrác, J., Košťáková, Monika, a Horák, Petr. Geographical distribution of the giant liver

- fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. *Veterinární Medicína*, 57(2):101–109, 2012.
- Keeler, Shamus P, Fried, B, a Huffman, Jane E. Association of bacteria with metacercarial cysts of *Echinostoma caproni*. *Parasitology research*, 101(4):1131–3, Sept. 2007.
- Kingscote, AA. Liver rot (fascioloidiasis) in ruminants. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 14(6):203–8, June 1950.
- Knapp, SE. Occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi) in Oregon Cattle and Deer. *The Journal of Parasitology*, 49(2), 1963.
- Kø ie, M, Christensen, N O, a Nansen, P. Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde Berlin Germany*, 51(1):79–90, 1976.
- Kø ie, M, Nansen, P, a Christensen, N O. Stereoscan studies of rediae, cercariae, cysts, excysted metacercariae and migratory stages of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 54(3):289–97, Dec. 1977.
- Krejci, K G a Fried, B. Light and scanning electron microscopic observations of the eggs, daughter rediae, cercariae, and encysted metacercariae of *Echinostoma trivolvis* and *E. caproni*. *Parasitology research*, 80(1):42–7, Jan. 1994.
- Laursen, J R a Yoshino, T P. Biomphalaria glabrata embryonic (Bge) cell line supports in vitro miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. *Parasitology*, 118 (Pt 2:187–94, Feb. 1999.
- Leontovyč, Roman, Košťáková, Monika, Siegelová, V., Melounová, Klára, Vrbová, Kristyna, Pankrác, J., Horák, Petr, a Kašný, Martin. Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *BMC veterinary research*.
- Lotfy, WM, Brant, SV Sara V, DeJong, Randy J RJ, Le, Thanh Hoa, Demiaszkiewicz, Aleksander, Rajapakse, R P V Jayanthi, Perera, Vijitha B V P, Laursen, J R, a Loker, Eric S. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(2):248–255, Aug. 2008.
- Mair, G R, Maule, a G, Shaw, C, Johnston, C F, a Halton, D W. Gross anatomy of the muscle systems of *Fasciola hepatica* as visualized by phalloidin-fluorescence and confocal microscopy. *Parasitology*, 117 (Pt 1(1897):75–82, 1998.

- Marinculić, Albert, Džakula, Nikola, Janicki, Z, Hardy, Zlatko, Luèinger, Snježana, a Živiè-njak, Tatjana. Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia - a case report. *Veternirski archiv*, 72(6):319 – 325, 2002.
- Marinković, Darko, Kukolj, Vladimir, Aleksić-Kovačević, Sanja, Jovanović, Milijan, a Kne-žević, Milijana. The role of hepatic myofibroblasts in liver cirrhosis in fallow deer (*Dama dama*) naturally infected with giant liver fluke (*Fascioloides magna*). *BMC veterinary research*, 9(1):45, Jan. 2013.
- Moore, M N a Halton, D W. A histochemical study of the rediae and cercariae of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 47(1):45–54, Aug. 1975.
- Naem, Soraya, Budke, Christine M, a Craig, T M. Morphological characterization of adult *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): first SEM report. *Parasitology research*, 110(2):971–8, Mar. 2012.
- Nikander, Sven. Origin, morphology, histochemistry and function of the mucosal mast cell and the globule leukocyte. A review. *Rangifer*, 11(1):3–11, Oct. 1991.
- Novobilský, Adam, Horáčková, Eva, Hirtová, Lenka, Modrý, David, a Koudela, Bretislav. The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology research*, 100(3):549–53, Feb. 2007a.
- Novobilský, Adam, Kašný, Martin, Mikes, Libor, Kovarcík, Kamil, a Koudela, Bretislav. Humoral immune responses during experimental infection with *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in goats and comparison of their excretory/secretory products. *Parasitology research*, 101(2):357–64, 2007b.
- Presidente, P J, McCraw, B M, a Lumsden, J H. Early pathological changes associated with *Fasciola hepatica* infection in white-tailed deer. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 38(3):271, 1974.
- Presidente, P J, McCraw, B M, a Lumsden, J H. Pathogenicity of immature *Fascioloides magna* in white-tailed deer. *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de médecine comparée*, 44(4):423–32, Oct. 1980.
- Pullin, R.S.V. Composition of the haemolymph of *Lymnaea truncatula*, the snail host of *Fasciola hepatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 40(3): 617–626, Nov. 1971.

- Pybus, MJ. Liver Flukes. In Samuel, William M., Pybus, Margo J., a Kocan, A. Alan, editors, *Infectious Diseases of Wild Mammals Second edition*, volume 45, pages 121 – 149. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, Oct. 2001. ISBN 9780470377000.
- Qureshi, T, Craig, T M, Drawe, D L, a Davis, D S. Efficacy of triclabendazole against fascioloidiasis (*Fascioloides magna*) in naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of wildlife diseases*, 25(3):378–83, July 1989.
- Robinson, G a Threadgold, L T. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. XII. The fine structure of the gastrodermis. *Experimental parasitology*, 37(1):20–36, Feb. 1975.
- Siegelová, V., Pankrác, J., Košťáková, Monika, Melounová, Klára, Siegel, T., Leontovyč, Roman, a Kašný, Martin. Nález motolice obrovské (*Fascioloides magna*) u skotu a zhodnocení rizik fascioloidózy v České republice. *Veterinářství*, 7:440 – 443, 2012.
- Sinitsin, DF. Studien über die Phylogenie der Trematoden. VI. The life histories of some American liver flukes. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 6(2):170 – 191, Nov. 1933.
- Smyth, James Desmond a Halton, D W. *The Physiology of Trematodes*. Cambridge University Press, Cambridge, 2nd. editi edition, 1983. ISBN 0 521 29434 7.
- Southgate, V. R. Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 61(02):177–190, 1970.
- Spoor, Melanie S, Royal, Angela B, a Berent, Linda M. The elusive globule leukocyte. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 40(2): 136, June 2011.
- Swales, W.E. The life cycle of *Fascioloides Magna* (Bassi, 1875), the large liver fluke of ruminants, in Canada. *Canadian Journal of Research*, 12(2):177–215, 1935.
- Swales, W.E. Further studies on *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917, as a parasite of ruminants. *Canadian Journal of Research*, 14(8):83–95, 1936.
- Thacker, H L. Final diagnosis: *Fascioloides magna* in spinal cord. In *Purdue University, West Lafayette, Diagnostic Forum Editor, Animal Disease Diagnostic Laboratory*, page 406, 2002.
- Thomas, AP. Memoirs: The Life History of the Liver-Fluke (*Fasciola hepatica*). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 23:99 – 133, 1883.
- Threadgold, L T. Electron-microscope studies of *Fasciola hepatica*. III. Further observations on the tegument and associated structures. *Parasitology*, 57(4):633–7, Nov. 1967.

- Valkounová, J, Žďárská, Z, a Našincová, V. Ultrastructural observations on the redia of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802). *Folia parasitologica*, 36(1):25–30, 1989.
- Vignoles, P, Novobilský, Adam, Rondelaud, D, Bellet, V, Treuil, P, Koudela, Bretislav, a Dreyfuss, G. Cercarial production of *Fascioloides magna* in the snail *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasitology research*, 98(5):462–7, Apr. 2006.
- Žďárská, Z, Našincová, V, a Valkounová, J. Multiciliate sensory endings in the redia of *Echinostoma revolutum* (Trematoda, Echinostomatidae). *Folia parasitologica*, 35(1):17–20, 1988.
- Ward, HB. On the structure and classification of North American parasitic worms. *The Journal of Parasitology*, 4(1):1–12, 1917.
- Wilson, R A. The structure and permeability of the shell and vitelline membrane of the egg of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 57(01):47–58, 1967.
- Wilson, R A. The fine structure of the protonephridial system in the miracidium of *fasciola hepatica*. *Parasitology*, 59(2):461–7, May 1969a.
- Wilson, R A. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica* L. *The Journal of parasitology*, 55(1):124–33, Feb. 1969b.
- Wilson, R A. Fine structure of the nervous system and specialized nerve endings in the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 60(03):399–410, Apr. 1970.
- Wilson, R A. Gland cells and secretions in the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 63(02):225 – 231, Apr. 1971.
- Wilson, R A. Gland cells in the redia of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 65(3):433–6, Dec. 1972.
- Wu, L. Further study on *Lymnaea stagnalis* (L.) as a snail host for *Fascioloides magna* (Bassi, 1875)(Trematoda). *The Journal of Parasitology*, 40(1):90–93, 1954.
- Záhoř, Z. Výskyt velké motolice (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) u srnčí zvěře. *Veterinářství*, 15:322–324, 1965.